



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Detección de *Salmonella* spp. en las caballerizas del Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM por medio de aislamiento microbiológico y Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

**MVZ. ISAAC DEL REAL PIÑA**

Tutora:

**Dra. María Masri Daba**

Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Comité tutor:

**Dr. Antonio Verdugo Rodríguez**

Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología e Inmunología:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

**Dr. Carlos Alberto Eslava Campos**

Unidad Periférica de Investigación Básica y Clínica en Enfermedades Infecciosas:  
Departamento de Salud Pública / División de Investigación, Facultad de Medicina UNAM;  
Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana; Unidad de Hemato Oncología e Investigación:  
Hospital Infantil de México Federico Gómez; UNAM.

**Ciudad de México, Junio 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria**

En este trabajo, se encuentran muchas de las alegrías, tristezas y experiencias acumuladas que me llevaron a realizarlo y concluirlo.

A mis padres, que siempre me alentaron para estudiar, a no dejarme caer y apoyarme en todo para llegar hasta aquí.

A mi hermana, que ha sido un ejemplo de dedicación y superación que hoy la ha llevado a especializarse en lo que más le gusta, a pesar de los mil obstáculos que se le presentaron antes de poder siquiera estudiar medicina.

A mi abuela Thelma, que esta pandemia no nos permitió seguir juntos y disfrutar de este logro, a ti hasta donde estés.

Pero sobre todo a mí, porque es un recordatorio de que si podemos lograr cosas importantes aun cuando lo cabeza dura nos esté llevando por los caminos más difíciles y tardados.

Mis perros adorados Niche, Chato, Nikita, Chispa y Camila, estoy seguro que algún día nos volveremos a encontrar, mientras Bimba me seguirá aleccionando.

## Agradecimientos

A la Doctora María Masri Daba por la oportunidad que me brindó como su tutorado.

Al Doctor Antonio Verdugo Rodríguez por permitirme realizar mi trabajo en el Laboratorio de Microbiología Molecular.

Al Doctor Carlos Eslava Campos porque, aunque no lo pareciera, si escuché sus consejos que fueron de gran ayuda para mi trabajo.

A mis amigos del LMM, Cloé, Liliana, Andrea, Dalia, Carlos, Leonardo, Rodrigo, Crescenciano y Saúl que hicieron mi paso por la tesis más llevadero.

A Fernanda, por mostrarme que puedo dejar de ser duro todo el tiempo, que aun cuando no esté en el sitio donde quisiera, tengo la capacidad de hacer bien mi trabajo y estarme impulsando a terminar este proceso.

A Julio, por haberme recibido desde 4° semestre como su alumno y ser mi amigo dentro y fuera del Laboratorio, quizás Alemania aún nos espera.

A Salvador, por ser mi amigo, por tantos viajes para echar chismecito, pero sobre todo por ayudarme en el desarrollo de mi trabajo y tenerme confianza para emprender.

A Graciela y Fernando, por ser mis amigos desde 2° semestre y seguir conmigo en las buenas y en las malas. La vida sin ustedes no tendría el loot suficiente para pasar a un Boss como Krauser.

A Julián que siempre está ahí para escucharme, aunque sea a distancia.

A la Doctora María Antonieta Mojica Sánchez, porque aun cuando ya no doy clases, haber entrado al Laboratorio de enseñanza me hizo mejor persona bajo su tutela.

A los que fueron mis alumnos, porque aprendí muchas cosas gracias a ellos y espero haber superado las expectativas de una “simple clase de laboratorio”.

## Índice

Índice de figuras.....	IV
Índice de cuadros.....	IV
Resumen .....	V
Abstract.....	VI
Abreviaturas.....	VII
Introducción .....	1
Género Salmonella.....	2
Patogenia .....	2
Justificación .....	4
Hipótesis .....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos específicos.....	4
Materiales y Métodos.....	5
Cepas Control.....	5
Muestreo de Instalaciones.....	5
Cultivo.....	5
Extracción de ADN .....	6
Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	6
Prueba de susceptibilidad a quimioterapéuticos.....	7
Resultados.....	8
Cultivo de muestras.....	8
Pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticos.....	13
Extracción de ADN y PCR .....	15
Discusión .....	19
Conclusiones .....	24
Prospectiva .....	24
Bibliografía.....	25
Anexo 1. Medios de Cultivo .....	30
Anexo 2. Soluciones .....	34

## **Índice de figuras**

- Figura 1. Fotografías de muestras tomadas de las instalaciones del Hospital de Équidos..... 9
- Figura 2. Fotografías de aislamientos a partir de las muestras de las instalaciones..... 10
- Figura 3. Aislamientos puros de las cepas sospechosas..... 13
- Figura 4. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas..... 15
- Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR del 2° muestreo..... 17
- Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR del 3° muestreo..... 17
- Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR del 5° muestreo..... 18

## **Índice de cuadros**

- Cuadro 1. Condiciones para la PCR..... 8
- Cuadro 2. Crecimientos en agar XLD sugerentes a partir de cultivos en caldo RVS..... 11
- Cuadro 3. Identificación de cepas sospechosas aisladas en agar XLD..... 14
- Cuadro 4. Pruebas de resistencia a quimioterapéuticos de cepas de *Salmonella* spp.....16
- Cuadro 5. PCR del gen invade las muestras de instalaciones del hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM..... 19

## Resumen

**Detección de *Salmonella* spp. en las caballerizas del Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM por medio de aislamiento microbiológico y Reacción en Cadena de la Polimerasa;** Del Real Piña Isaac, Masri Daba María, Eslava Campos Carlos Alberto y Verdugo Rodríguez Antonio.

La salmonelosis es una de las principales causas de cuadros gastroentéricos severos en équidos, y al tener distribución mundial genera un severo problema de salud pública debido a que es una enfermedad zoonótica. Los brotes nosocomiales de *Salmonella* spp. han servido no solo para la identificación de factores de riesgo, sino que también han evidenciado la presencia de animales portadores que generan contaminación cruzada en las áreas donde se encuentren. En México tanto la información epidemiológica de esta enfermedad en équidos, así como los reportes de casos cuyo origen sea intrahospitalario son nulos. Tomando en cuenta lo anterior, el trabajo realizado fue encaminado a la detección de *Salmonella* spp. dentro de las instalaciones del Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM con el objetivo de identificar posibles focos de infección, así como la obtención de cepas y datos referentes al género de *Salmonella* presente. El muestreo de instalaciones se realizó con metodología reportada por el CDC para el muestreo de superficies para *Bacillus anthracis*, la cual fue adaptada para el microorganismo en cuestión. El aislamiento bacteriológico fue acorde con la metodología reportada en la NOM-210-SSA-2014. De cada muestra obtenida se realizó extracción de ADN por el método de Tiocianato de Guanidina y posteriormente la PCR del gen *invA* para identificar el género de *Salmonella*. Los resultados obtenidos a partir de 5 muestreos realizados en distintas fechas de 25 sitios del Hospital de Équidos, generaron el aislamiento de 5 cepas identificadas como *Salmonella* spp. las cuales fueron caracterizadas como sensibles a quimioterapéuticos. La PCR fue positiva a 13 amplificaciones del gen *invA* coincidiendo en un 46% con los aislamientos, lo que indica la presencia de *Salmonella* spp. en las instalaciones del Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM, representando un potencial foco de infección para los pacientes.

## **Abstract**

**Detection of *Salmonella* spp. in the stables of the Equid Hospital of the FMVZ-UNAM by microbiological isolation and Polymerase Chain Reaction;** Del Real Piña Isaac, Masri Daba María, Eslava Campos Carlos Alberto and Verdugo Rodríguez Antonio

Salmonellosis is one of the main causes of severe gastroenteric conditions in equines, and as it is distributed worldwide it generates a severe public health problem due to the fact that it is a zoonotic disease. The nosocomial outbreaks of *Salmonella* spp. have served not only to identify risk factors but have also evidenced the presence of carrier animals that generate cross contamination in the areas where they are found. In Mexico, both the epidemiological information of this disease in equines, as well as the reports of cases whose origin is intrahospital are null. Taking into account the above mentioned, the work carried out was directed to the detection of *Salmonella* spp. inside the facilities of the Equids Hospital of the FMVZ-UNAM with the objective of identifying possible infection focuses, as well as obtaining strains and data referring to the genus of *Salmonella* present. The sampling of facilities was carried out with methodology reported by the CDC for the sampling of surfaces for *Bacillus anthracis*, which was adapted for the microorganism in question. The bacteriological isolation was according to the methodology reported in the NOM-210-SSA-2014. From each sample obtained, DNA extraction was carried out by Guanidine Thiocyanate method and later PCR of invA gene to identify *Salmonella* genus. The results obtained from 5 samples carried out in different dates from 25 sites of the Equine Hospital, generated the isolation of 5 strains identified as *Salmonella* spp. which were characterized as sensitive to chemotherapeutics. The PCR was positive to 13 amplifications of the invA gene coinciding in 46% with the isolations, which indicates the presence of *Salmonella* spp. in the facilities of the Equids Hospital of the FMVZ-UNAM, representing a potential source of infection for patients.



## Abreviaturas

spp. - especies  
pH. - potencial de Hidrogeno  
ADN. - Acido desoxirribonucleico  
ARN. - Ácido ribonucleico  
LPS. - Lipopolisacárido  
SCV. - *Salmonella*-Containing Vacuole  
SPI. - *Salmonella* Pathogenicity Island  
Cl.- Cloro  
FMVZ. - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
UNAM. - Universidad Nacional Autónoma de Mexico  
PCR. - Polimerase Chain Reaction  
Subsp. - subespecie  
cm.- centímetros  
Kb. - kilobases  
pb. - pares de bases  
ml.- mililitros  
°C.- grados Celsius  
XLD. - Xilosa Lisina Desoxicolato  
TSI. - Triple azúcar Hierro  
RVS. - Rappaport Vassiliadis Soya  
SE. - *Salmonella* Enteritidis  
SIM. - Sulfuro, Indol, Motilidad  
MPM. - Marcador de Peso Molecular  
LB. - Luria-Bertani  
UFC. - Unidades Formadoras de Colonia  
rpm. - Revoluciones por minuto  
s.- segundos  
µl.- microlitro

## **Introducción**

La Salmonelosis es una enfermedad zoonótica con una distribución a nivel mundial. Es ocasionada por bacterias del género *Salmonella* de la cual existen 2600 serovariedades que afectan a distintas especies de animales domésticos como silvestres. Es una de las causas del síndrome abdominal agudo en équidos.

Existen reportes en distintos países, acerca de brotes de salmonelosis nosocomial en equinos, dando como resultado afectaciones adversas en la salud de los pacientes conllevando en algunos casos a la muerte, así como a pérdidas económicas. (1,2).

Los factores de riesgo que deben tomarse en cuenta son la alimentación, el alojamiento y el transporte, así como el estado y el motivo de la visita al hospital, ya que en los caballos generan estrés, haciéndolos susceptibles a infecciones por *Salmonella*. De igual forma estos factores, pueden propiciar la liberación de la bacteria en heces al ambiente, lo cual permite que se generen brotes intrahospitalarios.

Es importante considerar la distribución de las instalaciones, pues en condiciones óptimas deben asignarse áreas específicas de aislamiento para aquellos pacientes que ingresen con sospecha de algún cuadro patológico infeccioso. Otra de las causas que se han identificado como factor de riesgo, son las cirugías abdominales, ya que los animales portadores pueden desarrollar la enfermedad durante el periodo de recuperación o puede producirse la liberación de la bacteria a lo largo de la estancia. (3,4)

En Estado Unidos de América se estima que, de cada 1000 caballos, la liberación (excreción de *Salmonella* spp.) se presenta en 8 ejemplares. Así mismo, en los hospitales de enseñanza se ha reportado que la incidencia del fenómeno es hasta del 9%. Además, se ha informado que los animales más afectados son aquellos que acuden a revisión rutinaria profiláctica o animales de acompañamiento como es el caso de las yeguas con potros con sepsis. (5)

Existen reportes de salmonelosis nosocomial en caballos durante su estancia en el servicio médico, mientras que otros, al ser dados de alta, regresan a sus lugares de origen y posteriormente presentan signos de enfermedad. Cualquiera de ambos escenarios representa un riesgo para los caballos, así como para personas y otros animales susceptibles a la infección, ya que los caballos que desarrollan la

enfermedad fuera del hospital propician la diseminación de la bacteria al contaminar superficies, favoreciendo la aparición de nuevos brotes.(6)

### **Género Salmonella.**

Son bacilos gram negativos, móviles por flagelos peritricos y anaerobios facultativos que poseen 3 antígenos principales: H (flagelo), O (somático) y Vi (capsular), este último sólo lo poseen algunas serovariedades como *Salmonella* Typhi. Fermentan la glucosa frecuentemente con producción de gas, reducen los nitratos a nitritos, descarboxílan lisina y ornitina y son negativos a la prueba de oxidasa.

### **Patogenia**

Se han reportado dos vías de transmisión para *Salmonella* spp., la vía vertical, la cual utiliza una ruta transovárica, presente en algunos serotipos pero que no ha sido descrita en equinos. Por otra parte, en la vía horizontal, la bacteria usa una ruta oral fecal para infectar al hospedero, principalmente por la contaminación de alimentos y del agua de bebida.

*Salmonella* spp. es ingerida por medio de agua o alimento y llega al estómago, el cual será la primera barrera fisiológica para evitar su diseminación. El pH ácido del compartimento gástrico, así como las enzimas digestivas que se secretan en el medio estomacal, funcionan como mecanismos de defensa en contra de *Salmonella*. Sin embargo, la bacteria expresa diferentes genes por medio de los cuales puede contrarrestar los efectos de los mismos, como son los sistemas de dos componentes *PhoQ/PhoP* o reguladores generales como *Fur*, que permiten que la bacteria resista condiciones de acidez. Otros genes involucrados permiten la utilización de bombas de protones que secretan el exceso de iones del citoplasma, así como el metabolismo de descarboxilación de lisina y arginina que permite el aumento del pH intracelular, entre otros. (7).

En el tracto intestinal, la bacteria debe sobrellevar a otros mecanismos fisiológicos inherentes al proceso de digestión, a diferentes condiciones osmóticas, de oxigenación, entre otros factores como las sales biliares, que representan una amenaza a la estabilidad celular de *Salmonella*, ya que su actividad detergente puede desestabilizar la membrana, generar daño al ADN de la bacteria o a las estructuras de ARN encargadas del metabolismo de traducción y a las proteínas del citoplasma provocando su desnaturalización. *Salmonella* expresa diferentes mecanismos moleculares, mediante los cuales disminuye los efectos adversos a los

que se enfrenta en el ambiente intestinal. Se ha reportado que el LPS es indispensable para la resistencia a las sales biliares, ya que la pérdida de la cadena "O" genera mutantes rugosas sensibles a la acción de la bilis. También se sabe que *Salmonella* puede sobrevivir en la vesícula biliar, esto de manera intracelular así como de forma extracelular con la formación de biopelículas.(8). En equinos, *Salmonella* coloniza la válvula ileocecal, ciego y colon. (9)

La adhesión bacteriana es necesaria para contrarrestar el peristaltismo intestinal y así dar comienzo a la colonización del tejido, con la posibilidad de diseminación en todo el sistema orgánico del hospedero. Para que *Salmonella* pueda mantener un estrecho contacto con los enterocitos y las células M en las placas de Peyer, expresa operones fimbriales que se encuentran distribuidos por toda la extensión de su cromosoma y que pueden variar en cantidades o en los tipos de fimbria para los que codifican, según la serovariedad de la que se trate. (10,11)

A pesar de que *Salmonella* tiene en su cromosoma 13 operones dedicados a la producción de fimbrias; no se ha podido demostrar su síntesis in vitro bajo las condiciones de crecimiento estándar de laboratorio, a excepción de las fimbrias Csg y Fim que son necesarias para la formación de las biopelículas y la sobrevivencia de la bacteria en condiciones adversas de crecimiento.

Una vez que la bacteria se encuentra firmemente adherida a su célula blanco, comienza la síntesis del Sistema de Secreción Tipo III también denominado inyectosoma y la translocación de efectores que permitirán la internación de la bacteria por medio de la modificación de la membrana y el citoesqueleto. Todo esto por medio de diferentes cascadas de señalización que son dirigidas por las Rho GTPasas, los factores NFkb, entre otros. El tráfico intracelular de la bacteria se da dentro de la vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV por sus siglas en inglés). Es en esta SCV en donde la bacteria expresa su isla de patogenicidad 2 (SPI -2 por sus siglas en inglés) que codifica para otro SST III que transloca diferentes de proteínas efectoras, para permitir la maduración de la SCV y el intercambio de marcadores celulares que determinarán la ruta de la SCV hasta su localización final en la región trans-Golgi. *Salmonella* puede replicarse dentro de esta SCV, liberarse y diseminarse hacia las células vecinas o finalmente diseminarse hacia la lámina propia del intestino, donde será fagocitada por células dendríticas o macrófagos que permitirán su diseminación hacia linfonodos mesentéricos u otros órganos del hospedero. (12–16)

En un cuadro clínico entérico, *Salmonella* ocasiona diarrea mediante el aumento de inositol-fosfato en la célula, que modifica la permeabilidad en la membrana con lo que expulsa  $\text{Cl}^-$  generando alteración osmótica que deriva en la salida de agua al

lumen intestinal. Cuando ocurre lisis celular en el epitelio intestinal, las bacterias son liberadas y arrastradas por las heces hacia el exterior; este evento genera zonas delimitadas de necrosis en pared del ciego y del colon, especialmente úlceras con forma de botón, observándose descargas sanguinolentas, con moco y cilindros intestinales.

## **Justificación**

El Hospital de Equinos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM no tiene establecido un sistema de monitoreo para la detección de *Salmonella* spp. que permita conocer el status microbiológico en la que ingresan los pacientes, así como aquellos animales que podrían adquirir Salmonelosis intrahospitalaria. Esta situación podría ocasionar el cierre de sus instalaciones generando pérdidas económicas, sin mencionar la problemática sanitaria ya que no solo es una enfermedad propia de los équidos, sino que también es un problema de salud pública.

## **Hipótesis**

*Salmonella* spp. se encuentra presente en las instalaciones del Hospital para Equinos de la FMVZ como potencial patógeno nosocomial

## **Objetivo General**

Detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras colectadas de distintos sitios de las instalaciones del Hospital para Équidos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por medio de cultivo microbiológico y PCR, para la identificación de focos de infección potenciales.

## **Objetivos específicos**

Aislar y detectar *Salmonella* spp. a partir de muestras obtenidas en instalaciones del Hospital para Équidos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Determinación de resistencia a quimioterapéuticos de cepas de *Salmonella* spp. aisladas a partir de muestras de las instalaciones del Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM

Identificar la presencia de otros microorganismos potencialmente patógenos

## **Materiales y Métodos**

### **Cepas Control**

Se emplearon como controles de calidad en el cultivo, así como para la PCR, las cepas de *Salmonella enterica* subsp. Enteritidis ATCC 49214 y *Salmonella entérica* subsp. Gallinarum cepa Reina-Acolman como controles positivos y *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo.

### **Muestreo de Instalaciones**

Se tomaron muestras de las caballerizas del Hospital para Équidos de la FMVZ-UNAM, así como de quirófanos y trampas de manejo.

Se utilizaron gasas estériles de 10 cm X 10 cm. impregnadas con agua peptonada al 0.1% (Ver Anexo 1) y se seleccionaron puntos aleatorios por cada superficie (Piso y paredes). El procedimiento se llevó cabo mediante la medición de un área de 900 cm<sup>2</sup> y posteriormente con la gasa impregnada, se realizaron movimientos en forma de "S", cubriendo toda la superficie de forma horizontal, vertical y diagonal.

Una vez realizados estos patrones sobre la superficie seleccionada, se introdujo en bolsas de cierre hermético con 225 ml de agua peptonada al 0.1%. Las muestras se llevaron a incubar a 37 °C durante 18 horas.

### **Cultivo**

A partir de las muestras incubadas, se tomaron 0.1 ml y se transfirió a un tubo con 10 ml caldo Rappaport-Vassiliadis (Ver Anexo 1) y se incubó a 42 °C por 24 horas. Posteriormente se tomaron 3 gotas del caldo y se inoculó una placa de Agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) (Ver Anexo 1) y Agar MacConkey (Ver Anexo 1). El método de siembra fue por estría cruzada y se incubó a 37 °C por 24 horas.

Las colonias observadas en el agar XLD se apreciaron como colonias grandes, de color rosa o roja con centro negro o completamente negras. En el caso del agar MacConkey fueron colonias grandes de color gris

Después de incubar, se seleccionaron las colonias sugerentes a *Salmonella* spp. y se les realizó tinción de gram (Ver Anexo 2) para identificar su morfología. posteriormente se inocularon las pruebas bioquímicas TSI, SIM, Citrato de Simmons y Urea (Ver Anexo 1) para identificar el género.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó por medio del método de Tiocianato de Guanidina descrito por Pitcher *et al.* (17) con algunas modificaciones realizadas de acuerdo a lo reportado por Acevedo (18).

A partir del tubo de caldo Rappaport-Vassiliadis inoculado e incubado, se transfirieron 2 ml a un microtubo y se centrifugó a 5,000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante para dejar solo la pastilla de bacterias acumuladas al fondo del tubo y así iniciar con la lisis celular agregando 225 µl de solución de lisis (Ver Anexo 2), homogenizando por medio de agitación de vórtice y posteriormente agregando 125 µl Acetato de amonio (Ver Anexo 2), mezclando por movimientos pendulantes e incubando a 4 °C durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 500 µl de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (Ver Anexo 2) y se homogenizó por agitación por vórtice durante 10 segundos para después centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos y obtener la fase acuosa para repetir los pasos anteriores; esto con la finalidad de purificar la muestra de ADN. Ya que se ha obtenido la fase acuosa, se agregaron 0.7 partes de Isopropanol, para la precipitación del material genético, y se incubó la muestra durante una hora en refrigeración y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 70% (Ver Anexo 2) y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos. Se desechó el etanol, eliminando la mayor cantidad posible y se dejó secar el comprimido formado para posteriormente hidratar con agua inyectable en un volumen de 20 a 40 µl.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Los iniciadores invA (Ver Anexo 2) fueron diseñados y reportados anteriormente por Rahn *et al.* (19) .

- InvaF 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'.
- InvaR 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3'.

Se realizó la PCR de un fragmento del gen *invA* que tiene un tamaño de 285 pares de bases con las siguientes condiciones:

T °C	Tiempo
95	5 min
95	30 s
42	45 s
72	30 s
72	5 min

Cuadro 1. Condiciones para la PCR.

### **Prueba de susceptibilidad a quimioterapéuticos**

Se realizaron antibiogramas basados en el método de Kirby-Bauer para determinar la resistencia a penicilina, cloranfenicol, ciprofloxacino, cefalexina, ceftriaxona, sulfametoxazol con trimetoprima y amikacina. La selección de estos antibióticos se realizó basados en el uso más común dentro del Hospital.

Se sembraron placas de LB (Ver Anexo 1) a 37 °C por 24 horas. posteriormente se tomaron colonias y se introdujeron en solución salina al 0.9% estéril hasta que la masa se disolviera y se estandarizó con el nefelómetro de McFarland del 0.5 para obtener  $1.5 \times 10^8$  UFC. Una vez que se ha igualó la disolución, un hisopo estéril, es impregnado con la muestra y posteriormente sobre placas de agar Müller Hinton, se sembró por medio de estría continua cerrada. Después se colocaron sobre la superficie del agar, los sensibilizadores impregnados con los antibióticos y se incubaron las muestras a 37 °C durante 24 horas para posteriormente medir los halos de inhibición siendo determinada la sensibilidad a los antibióticos utilizados(20–22).



## Resultados

### Cultivo de muestras

Se llevaron a cabo 5 muestreos en el periodo comprendido de enero 2018 a junio de 2019. Las fechas en que se realizaron los muestreos fueron 20/01/2018, 22/09/2018, 08/01/19, 28/04/2019 y 22/06/19. Se obtuvieron 25 muestras a partir de las instalaciones, 18 caballerizas, 2 quirófanos, 1 sala de recuperación, 2 trampas de manejo y 2 caballerizas de aislamiento. (Figura 1)

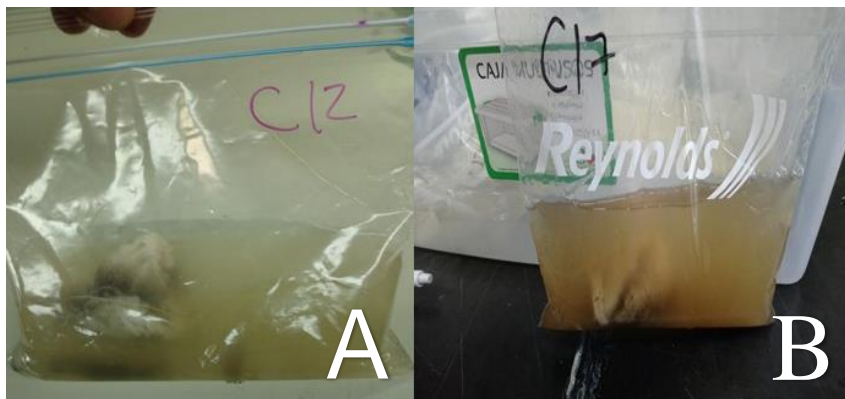


Figura 1. Fotografías de muestras tomadas de las instalaciones. Del lado izquierdo (A) se observa una muestra recién tomada y del lado derecho (B) una muestra incubada después de 24 horas.

De los muestreos realizados, en el segundo y quinto se observaron colonias de color rojo cubiertas de un precipitado negro en agar XLD, principalmente de las caballerías número 5, 9, 16 y 17. En el agar MacConkey, las colonias se apreciaron de color gris correspondientes a *Salmonella* spp. (Figura 2)

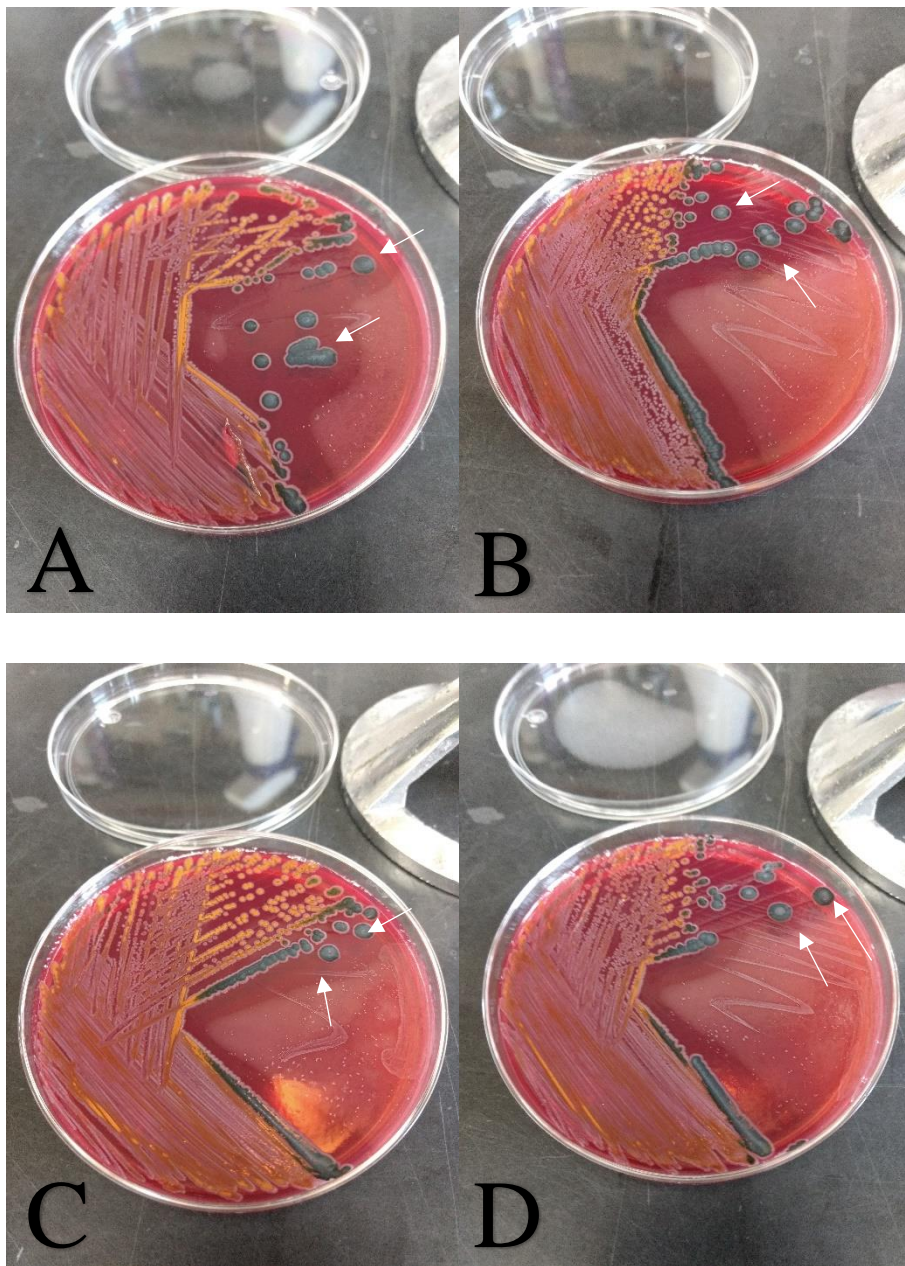


Figura 2. Fotografías de aislamientos a partir de las muestras de instalaciones del hospital inoculadas en caldo RVS. Agar XLD con crecimientos de colonias color rojo/rosa cubiertas de color negro, sugerentes a *Salmonella* spp. A: #5 B: #9 C: #16 D: #17.

**Cuadro 2** Crecimientos en agar XLD sugerentes a *Salmonella* spp. a partir de cultivos en caldo Rappaport-Vassiliadis.

Lugar	Muestreo				
	1	2	3	4	5
C1	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-
C4	-	-	-	-	-
C5	-	+	-	-	-
C6	-	-	-	-	-
C7	-	-	-	-	-
C8	-	-	-	-	-
C9	-	+	-	-	-
C10	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-
C13	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-
C16	-	+	-	-	-

C17	-	+	-	-	+
C18	-	+	-	-	-
Q1	-	-	-	-	-
Q2	-	-	-	-	-
SRec	-	-	-	-	-
TM1	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-

Cada cepa fue aislada en agar LB para tenerlas tener puras y poderlas mantener viables (Figura 3). De estos cultivos se obtuvieron 7 cepas y se les caracterizó por medio de pruebas bioquímicas (Figura 4). Solo 5 fueron identificadas *Salmonella* spp.

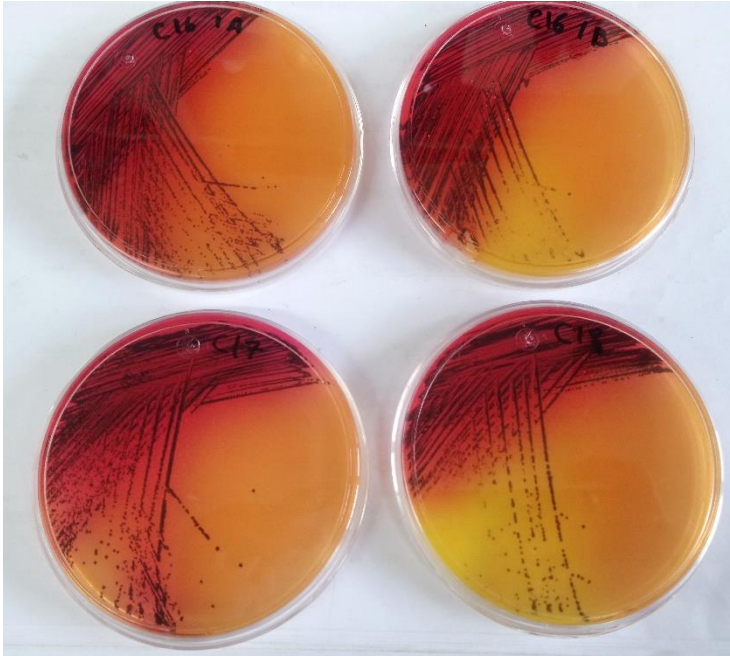


Figura 3. Cepas C16A, C16B, C17 y C18 de *Salmonella* spp. en cultivo puro en agar XLD.

### **Pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticos**

Una vez identificadas, se les realizó pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticos, con la finalidad de conocer la existencia de algún factor de resistencia que pudiera perpetuar su permanencia dentro del hospital como patógenos nosocomiales.

**Cuadro 3** Identificación de cepas sospechosas aisladas a partir de agar XLD.

Cepa	XLD	TSI	SIM	Citrato	Urea	ID
C5	R/N	2	+/-/+	+	+	<i>Proteus mirabilis</i>
C9	R/N	2	+/-/+	+	+	<i>Proteus mirabilis</i>
C16A	R/N	2	+/-/+	+	-	<i>Salmonella</i> spp.
C16B	R/N	2	+/-/+	+	-	<i>Salmonella</i> spp.
C17 s	R/N	2	+/-/+	+	-	<i>Salmonella</i> spp.
C17 q	R/N	2	+/-/+	+	-	<i>Salmonella</i> spp.
C18	R/N	2	+/-/+	+	-	<i>Salmonella</i> spp.

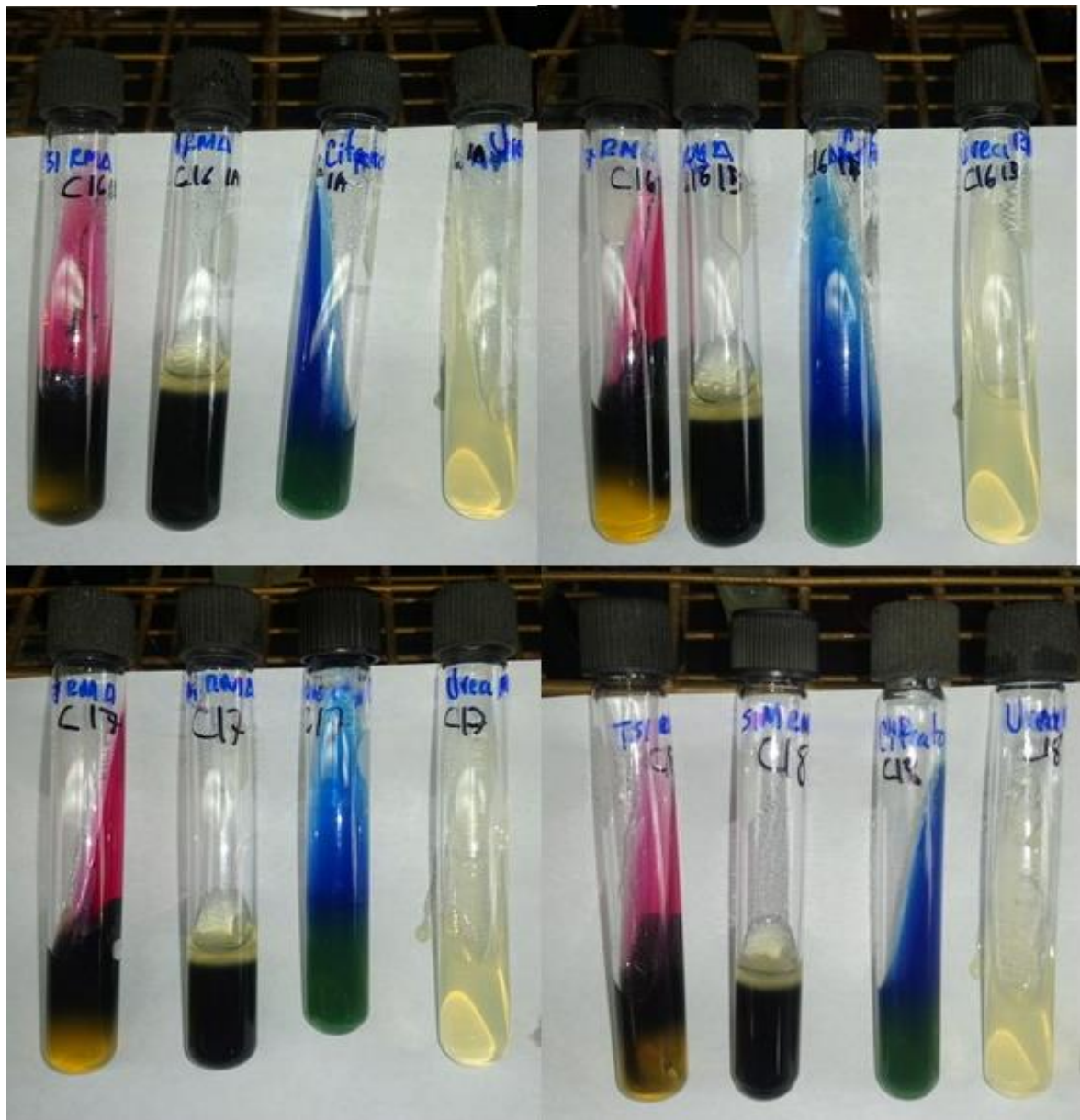


Figura 4. Pruebas bioquímicas de las cepas C16A, C16B, C17 y C18 confirmando la identificación del perfil positivo de *Salmonella* spp.

Con los aislamientos que se generaron a partir de los cultivos de enriquecimiento en caldo RVS (Ver Anexo 1), se identificaron otros géneros como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Proteus mirabilis* por medio de perfiles bioquímicos.

**Cuadro 4** Pruebas de resistencia a quimioterapéuticos de cepas de *Salmonella* spp. a partir de los aislamientos de las instalaciones del Hospital de équidos de la FMVZ-UNAM.

Cepa	P	C	CIP	CN	CRO	SXT	AK
C16A	R	S	S	S	S	S	S
C16B	R	S	S	S	S	S	S
C17s	R	S	S	S	S	S	S
C17q	R	S	S	S	S	S	S
C18	R	S	S	S	S	S	S

P= penicilina, C= cloranfenicol, CIP= ciprofloxacino, CN= cefalexina, CRO= ceftriaxona, SXT= sulfametoxazol con trimetoprima, AK= amikacina.

### **Extracción de ADN y PCR**

En los 5 muestreos se obtuvieron varios resultados positivos en distintas caballerizas, demostrando la presencia de *Salmonella* spp. aunque al momento de realizar los cultivos no se pudiera aislar alguna cepa de en todos los casos. En el muestreo #2 se detectó la presencia de *Salmonella* en 6 caballerizas, en el muestreo #3 solo en una caballeriza fue detectada y en el último muestreo se detectó en 6 caballerizas coincidiendo en algunas detecciones en las caballerizas del muestreo #2. (Figuras 5-7)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

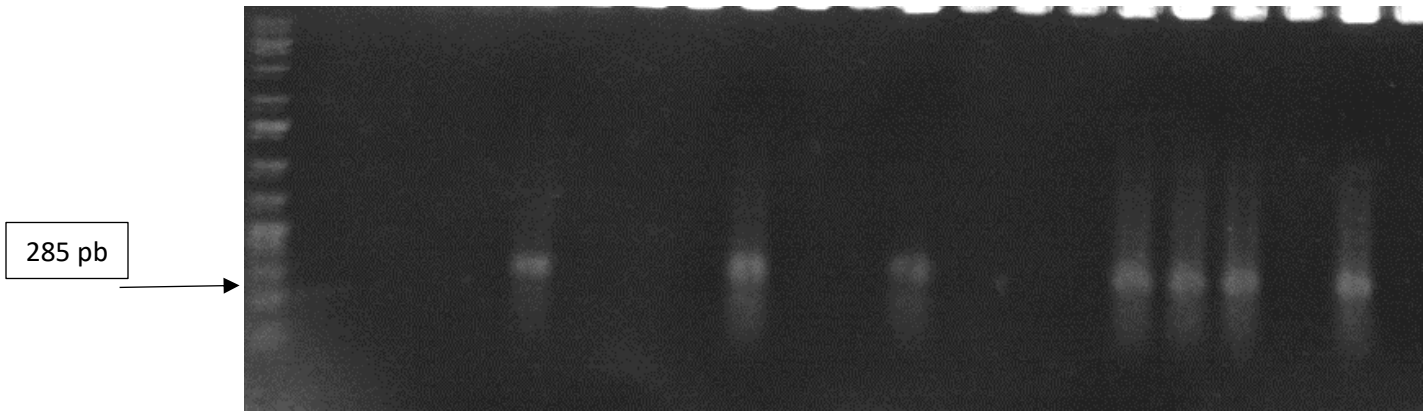


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa SB al 1% (Ver Anexo 2). Productos de la PCR obtenidos a partir del muestreo #2. Carril 1 MPM 1Kb plus, Carril 2-19 Caballerizas 1-18, Carril 21 control positivo SE, Carril 22 control negativo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

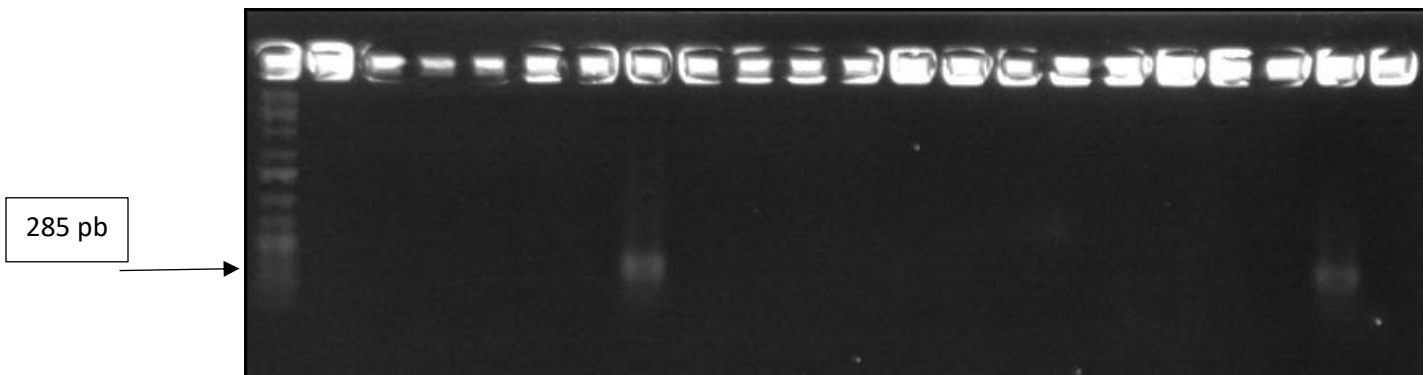


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa SB al 1%. Productos de la PCR obtenidos a partir del muestreo #3. Carril 1 MPM 1Kb plus, Carril 2-19 Caballerizas 1-18, Carril 20 control positivo SE, Carril 21 control negativo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa SB al 1%. Productos de la PCR obtenidos a partir del muestreo #5. Carril 1 MPM 1Kb plus, Carril 2-19 Caballerizas 1-18, Carril 20 control positivo SE, Carril 21 control negativo.

**Cuadro 5** PCR del gen *invA* de las muestras de las instalaciones del Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM

Lugar	Muestreo				
	1	2	3	4	5
C1	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-
C4	-	-	-	-	+
C5	-	+	-	-	+
C6	-	-	-	-	+
C7	-	-	+	-	-
C8	-	-	-	-	-
C9	-	+	-	-	-
C10	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	-	-
C12	-	+	-	-	+
C13	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	+
C15	-	-	-	-	-
C16	-	+	-	-	-

C17	-	+	-	-	+
C18	-	+	-	-	-
Q1	-	-	-	-	-
Q2	-	-	-	-	-
SRec	-	-	-	-	-
TM1	-	-	-	-	-
TM2	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-

## **Discusión**

En este trabajo, se logró aislar *Salmonella* spp. a partir de las instalaciones del Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM, el cual representa un sitio potencial de infección para pacientes que sean ingresados al servicio médico. La problemática que representan este tipo de situaciones, no solo es la generación de focos infecciosos sino pérdidas económicas ya que no solo se trata de un gasto para el propietario sino también para el recinto y esto se ve reflejado en las inversiones para la desinfección y sanitización de todas las instalaciones, la contratación de servicios que constaten que se encuentran libres de patógenos nosocomiales además de que dependiendo de la magnitud del problema podría ocasionar el cierre temporal del lugar para llevar a cabo las actividades pertinentes para garantizar un funcionamiento adecuado para no representar un riesgo futuro.

Los muestreos que se realizaron dentro del hospital, fueron aleatorios en cuanto a las fechas en que se llevaron a cabo. Esto con la finalidad de no predeterminar fechas y así prevenir de alguna manera al personal y que esto pudiera influir sobre la presencia o ausencia de *Salmonella* en las instalaciones.

Para el protocolo de muestreo de instalaciones se tomó como referencia uno descrito por los CDC para el género *Bacillus* (23), así como el procedimiento de cultivo y aislamiento fue basado en la NOM-210-SSA1-2014(24), los cuales tuvieron ciertas modificaciones puntuales como fueron la temperatura de incubación a 42°C para volverlo más selectivo y darle mayor ventaja al desarrollo de *Salmonella* sobre otras enterobacterias que pudieran estar presentes además de otros microorganismo del ambiente que también podrían ser cultivados. El empleo de caldo Rappaport-Vassiliadis, que es un medio de enriquecimiento, también genera una condición de selectividad, ya que la astringencia que éste produce, otorga cierta ventaja a *Salmonella* por encima de otras enterobacterias como *Escherichia coli* y *Proteus* (25).

También se modificó la metodología al usar como medio selectivo y diferencial de primera elección al agar XLD que nos da la ventaja sobre el verde brillante de poder detectar el género, ya que en el agar VB solo observamos la diferenciación de cepas fermentadoras o no de lactosa mientras el agar XLD nos da la posibilidad de obtener colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella* y además de aportarnos también información acerca de la capacidad de fermentación de carbohidratos. Estas modificaciones realizadas nos funcionaron como filtros para el aislamiento de 5 cepas de *Salmonella* spp. por lo que nos permite sugerir el empleo de agar XLD como medio selectivo de primera elección en las metodologías.

En este trabajo la PCR de *Salmonella* spp. mostro ser un método de detección sensible y específica, ya que a pesar de que se emplearon medios selectivos para limitar la presencia de otros microorganismos, esto no implica que no haya desarrollo simultaneo de otras cepas y aun así solo estar detectando la presencia de material genético perteneciente al género *Salmonella*.

La relación entre la detección de *Salmonella* spp. por medio de la PCR y los aislamientos podrían verse contradictorias, pero se debe tomar en cuenta que existen diversos factores que afectan el aislamiento. Una de las principales problemáticas al tratar de extraer una cepa de su nicho es el cambio ambiental al que será sometida la bacteria, ya que en ocasiones no se pueden adaptar al medio artificial y finalmente las bacterias nunca se desarrollan y hasta podríamos perder la cepa. Otra situación y que va de la mano con la anterior, es la cantidad de bacteria presente en la muestra, ya que, si se cuenta con una cantidad muy limitada de células, estas se pueden enfrentar a la competencia con otros microorganismos lo cual podría evitar el desarrollo o en su defecto, la pérdida de la cepa. Aunque pudiera suceder alguno de estos panoramas, la ventaja que nos proporciona la detección por PCR es que, con el simple hecho de la existencia de una copia de

material genético, en este caso de *Salmonella*, es más que suficiente para poder evidenciar la presencia de la bacteria en el sitio de donde fue extraída. (26)

Otro factor que también limita esta relación entre detección y aislamiento de microorganismos es la formación de biopelículas, diversos estudios han demostrado que *Salmonella* es una de bacteria productora de estas, lo cual le confiere muchas capacidades de supervivencia al ambiente en el que se encuentra (11,27,28). Las biopelículas son estructuras formadas por una matriz extracelular compuesta por fosfolípidos, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, que son elaborados por las propias bacterias. Al generar estas biopelículas, las bacterias se encuentran protegidas de distintas adversidades como la presencia de desinfectantes, radiación por rayos ultravioleta, cambios osmóticos, variaciones de pH, deshidratación, la acción de antimicrobianos, respuesta inmune por parte de los hospederos y toxicidad. La capacidad de los microorganismos de generar estas estructuras es una de las principales preocupaciones dentro de los hospitales tanto de medicina humana como veterinaria, ya que son una fuente de contaminación persistente debido a que se van liberando estos microorganismos paulatinamente en distintos momentos. (29)

En la formación de biopelículas, no se puede hablar de la presencia de un solo microorganismo presente, aunque existe evidencia acerca de que los microorganismos tienen la capacidad de construirlas de forma individual. por lo general están involucrados diversos géneros bacterianos que aportan diversos factores al nicho que se ha construido, desde nutrimentos hasta intercambio de genes de supervivencia (30).

El aislamiento de cepas como *Klebsiella*, *Proteus* y *Citrobacter* a partir de las muestras, nos permite pensar en la existencia de biopelículas capaces de estar protegiendo la integridad de distintos géneros bacterianos tanto patógenos como saprófitos. Es importante señalar que las biopelículas cumplen con una dinámica de formación cumpliendo con 4 etapas: invasión, formación de microcolonias, maduración y dispersión. La etapa de dispersión es de gran importancia ya que es el momento en el que son liberadas diversas bacterias para permitir la colonización de otras zonas, lo cual al momento de la toma de muestras nos permite detectar mayor cantidad de géneros bacterianos y así poder evidenciar su presencia. Para contrarrestar este efecto, sugeriría desarrollar un protocolo de debilitamiento de biopelículas, de forma que, al coleccionar y analizar las muestras, la posibilidad de obtener más cepas de *Salmonella* se incremente. (31)

Una vez que se aislaron las cepas de *Salmonella* spp. se determinó el perfil de resistencia y susceptibilidad donde se emplearon betalactámicos, fluoroquinolonas,

fenicoles, aminoglucósidos, cefalosporinas y sulfonamidas.(32,33) A pesar de solo presentar resistencia a betalactámicos, la presencia de la formación de biopelículas aumenta la probabilidad de la adquisición de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos. Diversos reportes de brotes intrahospitalarios han documentado la adquisición de resistencia en periodos cortos de tiempo entre sus muestreos, demostrando bacterias que presentan resistencia a 3 antibióticos en el primer desafío y al repetir los muestreos ya han aumentado su resistencia al doble.(34)

Detectar la presencia de un patógeno en instalaciones de manera consecutiva, es indicativo de que los protocolos de desinfección no son efectivos, esto puede suceder por diversos factores como(35):

- la presencia de materia orgánica genera la inactivación de algunos productos.
- el tiempo que el desinfectante está en contacto en la superficie es crucial para que pueda llevar a cabo su acción.
- la temperatura a la que está actuando el desinfectante, ya que algunos productos requieren de su modificación para poder desnaturalizar las membranas celulares
- la concentración en la se encuentra ya que, si no se realiza la dilución adecuada, el producto podría ser insuficiente para entrar en contacto correctamente y no generará ningún efecto.
- El pH, ya que al hacer sinergia con la temperatura puede llevar a cabo su actividad desinfectante con mayor eficacia.
- Las características de los productos, ya que pueden ser bacteriostáticos o bactericidas.

Pero no solo es una cuestión inherente a los productos empleados, pues así como existe la transmisión de genes de resistencia a quimioterapéuticos, las bacterias pueden adquirir factores de resistencia a desinfectantes, algunos de los cuales son intrínsecos como la expresión de genes para la generación de bombas de protones para la neutralización de los cambios de pH o la expresión de bombas de expulsión transmembranales que sirven para sacar del interior de la célula las sustancias que están generando una agresión(36). Por lo tanto se deben de evaluar la efectividad

de los desinfectantes a utilizar para poder conocer qué tipo de productos son los más adecuados, identificando la concentración correcta y la susceptibilidad de los microorganismos a estos.(37)

La detección e identificación de *Salmonella* spp. en las caballerizas de uso general, representa un importante foco de infección y se debe de tomar en cuenta que entran animales, que puedan encontrarse inmunocomprometidos, lo cual genera la posibilidad de que adquieran infecciones intrahospitalarias. También debe considerarse que los procedimientos a los que son sometidos los pacientes pueden generar estrés, lo cual estimulará la excreción de bacterias patógenas en lugares de uso común, que aunado a fallas en los métodos de desinfección producirían focos de infección.(38)

Los protocolos de admisión deben desarrollarse uno capaz de separar animales en función del motivo inicial de entrada al hospital (Ambulatorios, Hospitalizados, Sospechosos de Enfermedades infecciosas).

Este trabajo estuvo enfocado en la detección de *Salmonella* en las instalaciones del hospital, pero existe otra parte muy importante y es el personal que labora dentro del recinto, porque son tanto un factor de diseminación como un punto de infección. El descuido de los detalles en la higiene del personal (por ejemplo, al no desinfectarse entre un paciente y otro), así como de la correcta desinfección del material médico da lugar a fómites.

La integración de un protocolo de seccionamiento de los pacientes también debe de ser aplicable para el personal, de forma que permanezcan en una sola área al día (con sus respectivos enseres y utensilios médicos exclusivos de la misma) con el fin de evitar contaminación cruzada. Como se había mencionado en la introducción, la salmonelosis es una enfermedad que puede transmitirse de animales a humanos y viceversa por lo tanto, detectar la presencia de *Salmonella* en las caballerizas representa un riesgo para las personas que laboran en el hospital, lo cual puede generar mermas en la productividad y la realización de las tareas diarias.(39)



## **Conclusiones**

Se detectó y aisló *Salmonella* spp. a partir de muestras de instalaciones del Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM.

Se determinó ausencia de resistencia a quimioterapéuticos presente en las cepas de *Salmonella* spp.

Se aislaron diversas cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* como posibles patógenos.

La prueba de PCR tiene mayor sensibilidad al realizar la detección a comparación de la metodología de cultivo de *Salmonella* spp.

## **Prospectiva**

Desarrollar un protocolo de muestreo en los caballos que ingresen al hospital para detectar posibles diseminadores de *Salmonella* spp.

Caracterizar perfiles de resistencia a quimioterapéuticos de los otros géneros bacterianos aislados durante los muestreos y que son de importancia clínica.

Realizar pruebas de resistencia a desinfectantes a partir de aislamientos de muestras de las instalaciones.

## **Bibliografía**

1. Ewart SL, Schott HC, Robison RL, Dwyer RM, Eberhart SW, Walker RD. Identification of Sources of Salmonella Organisms in a Veterinary Teaching Hospital and Evaluation of the Effects of Disinfectants on Detection of Salmonella Organisms on Surface Materials. *J Am Vet Med Assoc*. 2001;218(7):1145–51.
2. Ruple-Czerniak A, Bolte DS, Burgess BA, Morley PS. Comparison of two sampling and culture systems for detection of *Salmonella enterica* in the environment of a large animal hospital. *Equine Vet J*. 2014;46(4):499–502.
3. Alinovi CA, Ward MP, Couëtil LL, Ching C. Risk factors for fecal shedding of *Salmonella* from horses in a veterinary teaching hospital. 2003;60:307–17.
4. Jay-Russell MT, Madigan JE, Bengson Y, Madigan S, Hake AF, Foley JE, et al. *Salmonella* Oranienburg Isolated from Horses, Wild Turkeys and An Edible Home Garden Fertilized with Raw Horse Manure. *Zoonoses Public Health*. 2014;61(1):64–71.
5. Ward MP, Alinovi CA, Coue LL, Wu CC. Evaluation of a PCR to detect *Salmonella* in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. 2005;123:118–23.
6. Hartnack AK, Metre DC Van, Morley PS. *Salmonella enterica* shedding in hospitalized horses and associations with diarrhea occurrence among their stablemates and gastrointestinal-related illness or death following discharge. *J Am Vet Med Assoc*. 2012;240(6).
7. Hall HK, Foster J w. The Role of Fur in the Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium* Is Physiologically and Genetically Separable from Its Role in Iron Acquisition. 1996;178(19):5683–91.
8. Álvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, et al. *Salmonella* spp . survival strategies within the host gastrointestinal tract. 2011;1:3268–81.
9. Kolk JH Van Der, Kroeze EJBV. *Infectious Diseases of the Horse*. London: Manson Publishing; 2013. 336 p.

10. Allen-Vercoe E, Woodward MJ. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. *J Med Microbiol.* 1999;48(8):771–80.
11. Crawford RW, Reeve KE, Gunn JS. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *J Bacteriol.* 2010;192(12):2981–90.
12. Deiwig J, Salcedo SP, Boucrot E, Gilliland SM, Henry T, Petermann N, et al. The Translocated *Salmonella* Effector Proteins SseF and SseG Interact and Are Required To Establish an Intracellular Replication Niche □. 2006;74(12):6965–72.
13. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(1):53–66.
14. LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI. *Salmonellae* interactions with host processes. *HHS Public Access.* 2016;36(5):1011–4.
15. Perez-lopez A, Behnsen J, Nuccio S, Raffatellu M. Mucosal immunity to pathogenic. *Nat Publ Gr [Internet].* 2016;16(3):135–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2015.17>
16. Barrow PA. The paratyphoid salmonellae Description of the disease in poultry. 2000;19(2):351–75.
17. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol.* 1989;8(4):151–6.
18. Acevedo Monroy SE. Detección molecular de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli* diarrogénica a partir de huevo. Vol. 6. 2019.
19. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, et al. Amplification of *invA* gene of *Salmonella* by polymerase chain reaction (PCR) as a specific method for detection of *Salmonellae*. *J Fac Vet Med Univ Tehran.* 1992;61(2):195–9.
20. Mcfarland J. THE NEPHELOMETER: AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES. 1907;9–11.

21. Bauer, A W, Kirby, W, M M, Sherris, J C, Turk M. ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING BY A STANDARDIZED SINGLE DISK METHOD. 1966;45(4).
22. Kiflu B, Alemayehu H, Abdurahaman M, Negash Y, Eguale T. Salmonella serotypes and their antimicrobial susceptibility in apparently healthy dogs in Addis Ababa, Ethiopia. BMC Vet Res. 2017;13(1):1–9.
23. Centers for Disease Control and Prevention. Surface sampling procedures for Bacillus anthracis spores from smooth, non-porous surfaces. NIOSH Work Saf Heal Top [Internet]. 2012;1–9. Available from: <http://www.cdc.gov/niosh/topics/emres/surface-sampling-bacillus-anthraxis.html>
24. Salud. S de. NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Diario Oficial de la Federación. México; 2015. p. 96.
25. Lyle CH, Annandale CH, Gouws J, Morley PS. Comparison of two culture techniques used to detect environmental contamination with Salmonella enterica in a large-animal hospital. J S Afr Vet Assoc. 2015;86(1):1–5.
26. Charlton BR, Walker RL, Kinde H, Bauer CR, Channing-Santiago SE, Farver TB. Comparison of a Salmonella Enteritidis-specific polymerase chain reaction assay to delayed secondary enrichment culture for the detection of Salmonella Enteritidis in environmental drag swab samples. Avian Dis. 2005;49(3):418–22.
27. Beshiru A, Igbinosa IH, Igbinosa EO. Biofilm formation and potential virulence factors of Salmonella strains isolated from ready-to-eat shrimps. PLoS One. 2018;13(9):1–22.
28. MacKenzie KD, Palmer MB, Köster WL, White AP. Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic Salmonella Strains to Colonize Multiple Host Species. Front Vet Sci [Internet]. 2017;4(August):1–19. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2017.00138/full>
29. Tolker-nielsen TIM. Biofilm Development. 2015;1–12.

30. Moryl Magdalena, Torzewska Agnieszka, Jalmuzna Pawel RA. Analysis of *Proteus mirabilis* Distribution in Multi-Species Biofilms on Urinary Catheters and Determination of Bacteria Resistance to Antimicrobial Agents. *Polish J Microbiol.* 2013;62(4):377–84.
31. Drzewiecka D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb Ecol* [Internet]. 2016;72(4):741–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>
32. Dunowska M, Morley PS, Traub-Dargatz JL, Hyatt DR, Dargatz DA. Impact of hospitalization and antimicrobial drug administration on antimicrobial susceptibility patterns of commensal *Escherichia coli* isolated from the feces of horses. *J Am Vet Med Assoc.* 2006;228(12):1909–17.
33. Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiol Res* [Internet]. 2018;206(May 2017):60–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>
34. Dargatz DA, Traub-Dargatz JL. Multidrug-resistant *Salmonella* and nosocomial infections. *Vet Clin North Am - Equine Pract.* 2004;20(3):587–600.
35. Martelli F, Lambert M, Butt P, Cheney T, Tatone FA, Callaby R, et al. Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in *Salmonella* contaminated pig holdings in the United Kingdom. *PLoS One.* 2017;12(6):1–20.
36. Alam MS, Takahashi S, Ito M, Komura M, Suzuki M, Sangsriratanakul N, et al. Bactericidal efficacy of a quaternary ammonium compound with food additive grade calcium hydroxide toward *Salmonella Infantis* and *Escherichia coli* on abiotic carriers. *J Vet Med Sci.* 2018;80(10):1482–9.
37. Martelli F, Gosling RJ, Callaby R, Davies R. Observations on *Salmonella* contamination of commercial duck farms before and after cleaning and disinfection. *Avian Pathol.* 2017;46(2):131–7.
38. Dunowska M, Morley PS, Traub-Dargatz JL, Davis MA, Patterson G, Frye JG, et al. Comparison of *Salmonella enterica* serotype *Infantis* isolates from a veterinary teaching hospital. *J Appl Microbiol.* 2007;102(6):1527–36.

39. Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E, Bauerfeind R, Prenger-Berninghoff E, Imirzalioglu C, et al. Multiresistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol.* 2014;14(1):1–13.

## **Anexo 1. Medios de Cultivo**

### **Caldo Luria Bertani (LB)**

Cloruro de Sodio (JT Baker®) 10 g

Peptona de caseína (Difco®/MCDLab®) 10 g

Extracto de levadura (Bioxon®) 5 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

### **Agar LB**

Al preparar caldo LB agregar 15 g de agar-bacteriológico (Difco®/ MCDLab®) para 1 L.

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

### **Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)**

Lactosa 7.5 g

Sacarosa 7.5 g

Extracto de levadura 3 g

Tiosulfato sódico 6.8 g

Citrato férrico de amonio 0.8 g

Xilosa 3.5 g

L-Lisina 5 g

Desoxicolato de sodio 2.5 g

Rojo de fenol 0.08 g

Agar 13.5 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y hervir durante 5 min, no sobre calentar, permitir que se enfríe a 45°C y dispensar

No autoclavar

Usar el mismo día de preparación

### **Agar MacConkey (McC)**

Digerido pancreático de gelatina 17 g

Peptona de carne y caseína 3 g

Lactosa 10 g

Rojo neutro 0.03 g 50

Cristal violeta 0.001g

Sales biliares 1.5 g

Agar 13.5 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

### **Agar triple azúcar hierro (TSI)**

Digerido pancreático de caseína 10 g

Digerido péptico de tejido animal 10 g

Cloruro sódico 5 g

Lactosa 10 g

Sacarosa 10 g 52

Glucosa 1 g

Sulfato ferroso de amonio 0.2 g

Tiosulfato sódico 0.2 g

Rojo fenol 0.025 g

Agar 13 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar posicionando el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

### **Medio SIM**

Extracto de carne 3 g

Hidrolizado pancreático de gelatina 30 g

Sulfato ferroso amónico 0.2 g

Tiosulfato sódico 0.025 g

Agar 3 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes calentando hasta ebullición y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.



### **Agar citrato de Simmons**

Fosfato de amonio dihidrogenado 1 g

Fosfato dipotásico 1g

Cloruro sódico 5 g

Citrato sódico 2 g

Sulfato magnésico 0.2 g

Agar 15 g

Azul de bromotimol 0.08 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar posicionando el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

### **Agar urea de Christesen**

Hidrolizado pancreático de gelatina 1 g

Dextrosa 1 g

Cloruro sódico 5 g

Fosfato potásico 2 g

Urea 20 g

Rojo Fenol 0.012 g

Agar 15 g

Disolver el agar en 950 mL de agua, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Atemperar el agar a 45°C, los demás componentes disueltos en 50 mL de agua destilada, esterilizar por filtración incorporándolos al agar, dispensar en tubos.

Enfriar posicionando el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

### **Caldo Rappaport-Vassidialis (RV)**

#### **Base de RVS**

Digerido enzimático de soya 5 g

NaCl 8 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g

#### **Solución de MgCl<sub>2</sub>**

MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 40 g disolver en 100 mL de agua destilada y almacenar en oscuridad, máximo 1 año. No autoclavar.

### **Solución de verde de malaquita**

Disolver 0.4 g de oxalato de verde de malaquita en 100 mL de agua destilada y almacenar en frasco ámbar en oscuridad. No autoclavar.

### **Preparación del medio RV**

Mezclar para 1000 mL de medio base después agregar la solución de MgCl<sub>2</sub> y verde de malaquita, dispensar en tubos un volumen de 10 mL y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Emplear el mismo día o almacenar a 4°C máximo 24 horas.

### **Agua peptonada al 0.1%**

Caseína de carne 10 g

Cloruro de sodio 5 g

Disolver 1 g de la mezcla en 1000 ml de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Guardar en oscuridad hasta el día que se va usar.

## **Anexo 2. Soluciones**

### **Reactivos para identificación e interpretación de bioquímicas**

#### **Reactivo de Kovac (para detección de indol)**

Alcohol isoamílico 150 mL

p-dimetilaminobenzaldehído 10 g

HCl 50 mL

Disolver el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol isoamílico (amílico o butílico), una vez incorporado se agrega el HCl, almacenar en frasco ámbar en refrigeración.

#### **Prueba de oxidasa**

N, n, n, n-tetrametil-p-fenilendiamina

Impregnar una porción de papel filtro (7 cm de diámetro) con 3 gotas de solución acuosa al 1 % del reactivo, secar a temperatura ambiente (no secar por completo) y congelar -20 °C.

#### **Tinción de Gram**

Colorante primario:

Cristal Violeta 2.5 g

H<sub>2</sub>O destilada 1000 ml

Almacenar en frasco ámbar.

Sensibilizante:

NaHCO<sub>3</sub> (Bicarbonato de sodio) 12.5 g

H<sub>2</sub>O destilada 1000 ml

Almacenar en frasco ámbar.

Mordente:

Iodo 20 g

NaOH solución acuosa al 1 M 100 ml

H<sub>2</sub>O destilada 900 ml

Almacenar en frasco ámbar.

Decolorante:

Alcohol Etílico 95 % 50 ml

Acetona 50 ml

Almacenar en frasco ámbar.

Colorante de contraste:

Fucsina Básica, solución saturada en alcohol de 95% 100 ml

H<sub>2</sub>O destilada 900 ml

Almacenar en frasco ámbar.

### **Reactivo de Gregensen (corroborar tinción de Gram)**

KOH 3 g

H<sub>2</sub>O destilada 100 mL

Disolver cuidadosamente el hidróxido en el agua ya que es corrosivo, almacenar en frasco ámbar en refrigeración.

### **Soluciones para electroforesis**

#### **Solución borato de sodio (SB) 25X**

NaOH (JT Baker®) 25 mM disolver en agua destilada y ajustar pH con ácido bórico (JT Baker®) a 8.0-8.5

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb

Solución de trabajo 1X.

#### **Amortiguador de carga para ADN**

Glicerol o Sacarosa (Sigma-Aldrich®) 30-40 % (w/v)

Xilencianol (Sigma-Aldrich®) 0.25 % (w/v)

Azul de bromocresol (Sigma-Aldrich®) 0.25 % (w/v)

Naranja G (Sigma-Aldrich®) 0.50-0.75 % (w/v)

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb

Solución de trabajo 1 X (Realizar Dilución con solución TAE o SB según sea el caso).

#### **Agarosa con SB 1 %**

Agarosa grado biología molecular (Invitrogen®) 1 g

Solución SB 1x 100mL

Calentar hasta ebullición y disolución de la agarosa y enfriar hasta 50 °C y vaciar.

### **Soluciones para extracción de ADN**

#### **Solución de lisis**

1.66 M tiocianato de guanidina (Sigma-aldrich®)

N-Sarcosyl (Sigma-Aldrich®) 0.16%

EDTA Na (JT Baker) pH 8.0 a 0.5M

Disolver todos los reactivos en agua Mili Q y aforar a 150 mL

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb, almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

**Acetato de amonio 7.4 M**

7.4 M Acetato de amonio (JT Baker®) 100 mL  
Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb  
Almacenar a -20 °C.

**Fenol-cloroformo**

Fenol (Sigma-Aldrich) 25 mL  
Cloroformo (JT Baker®) 25 mL  
Almacenar en frasco ámbar en refrigeración 4°C.

**Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico**

Fenol (Sigma-Aldrich) 25 mL  
Cloroformo (JT Baker®) 24 mL  
Alcohol isoamílico (JT Baker®) 1 mL  
Almacenar en frasco ámbar en refrigeración 4°C.

**Etanol 70%**

Alcohol etílico absoluto (JT Baker®) 70 mL  
H<sub>2</sub>O libre de nucleasas 30 mL  
Almacenar a -20°C.

**Soluciones y reactivos para la PCR****DNTP's (Invitrogen®/Thermo Scientific Fisher®)**

ATP 100 mM  
CTP 100 mM  
GTP 100 mM  
TTP 100 mM

Agregar 10 µL de cada dinucleótido a 60 µL de agua estéril libre de nucleasas, almacenar a -20 °C.

**Iniciadores (Invitrogen®/Sigma Aldrich®)**

Iniciador F' (En sentido) 100 µM  
Iniciador R' (Antisentido) 100 µM

Diluir por separado 10 µL de cada iniciador en 90 µL de agua libre de ADNasas, almacenar a -20 °C.

**Polimerasa de *Thermus aquaticus* recombinante (Thermo Scientific Fisher®)**

*Taq*Pol 5 U/  $\mu$ L

No diluir, si se requiere diluir emplear dimetilsulfoxido o Polietilenglicol

Almacenar a -20 °C.