

Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

Análisis descriptivo de la prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Salmonella enterica* no tifoidea durante el periodo postparto de vacas lecheras en la Región Central y Norte de Costa Rica.

Modalidad: Tesis de Grado

Trabajo Final de graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria

Autor: Gustavo Huertas Sánchez

Tutora: Lohendy Muñoz Vargas, Ph.D.

Lector: Elías Barquero Calvo, Ph.D.

Lector: Carlos Alpízar Solís, M.Sc.

Campus Benjamín Núñez, Heredia

2020

Tribunal Examinador

Laura Sofía Bouza Mora, Msc.
Vicedecana, Facultad de Ciencias de la Salud

Julia Rodríguez Barahona
Subdirectora, Escuela de Medicina Veterinaria

Lohendy Muñoz Vargas, PhD.
Tutora

Elías Barquero Calvo, PhD.
Lector

Carlos Alpízar Solís, M.Sc
Lector

Fecha: _____

Dedicatoria y agradecimientos

Me gustaría dedicar este proyecto a mi familia, mis padres quienes han estado presentes durante toda mi carrera universitaria y me han apoyado en cada decisión que he tomado, en cada momento de inseguridad ellos han logrado motivarme y renovar mi confianza propia para continuar y poder salir adelante, son una fuente de inspiración para mí y sin ellos jamás estaría cumpliendo esta meta tan importante dentro de mi vida, los amo de todo corazón. A mis hermanos quienes han estado acompañándome y me han ayudado al igual que mis padres a confiar en mí mismo y mantener la cabeza firme, su apoyo ha sido invaluable para mí, los amo y ojalá podamos seguir compartiendo miles de experiencias más durante los próximos años. Por último, a mis amigos quienes han hecho que este viaje fuera tan agradable, cada paso dentro de la carrera que di fue con la compañía de ellos y son quienes lograban colocar una sonrisa en mi rostro cada vez que sentía pesar en mi corazón

Me gustaría agradecer a todos dentro del Laboratorio de Bacteriología, a Elías, Dylcia, Cindy, Dionei, Lauren y Verónica, su ayuda a sido invaluable, sus enseñanzas han sido fundamentales y su compañía ha sido increíble, agradezco todo lo que han logrado inculcar en mí y realmente no hay mejor laboratorio donde se pudiera trabajar, a Verónica en especial y a su compañero Adonay por haberme ayudado en hacer los mapas para el proyecto. A don Miguel Bolaños, quien me ha colaborado enormemente en la colecta de granjas para poder realizar los muestreos, realmente agradezco todo el tiempo que tomó de su trabajo para poder brindarme ayuda. Al doctor Alpízar por acceder a ser lector de mi proyecto y dedicar parte de su tiempo en dar guía y consejo para poder mejorar el trabajo.

Le agradezco a la doctora Lohendy, quien desde el momento que llegó a la universidad fue una guía que estuve dispuesto a seguir hasta el final, una mis mayores modelos a seguir en la vida, sin su apoyo, dedicación, paciencia y amor a este proyecto, definitivamente no habría sido capaz de lograr culminarlo, gracias por abrirme los ojos a toda una rama de la veterinaria de la cual me enamoré y en donde deseo desarrollarme como profesional, una tutora increíble, gracias por haber confiado en mí.

Por último, agradecer a Dios por haberme dado la vida, por haberme permitido nacer en una familia tan cariñosa y motivadora, por haberme permitido entrar a esta carrera, por haberme permitido conocer a personas tan increíbles que me han enseñado tanto y me han dado lecciones de vida que probablemente en ningún otro lado habría podido haber aprendido, infinitas gracias por haberme permitido llegar hasta aquí.

Abreviaturas

AGNES = Ácidos grasos no esterificados

AM = Ampicilina

AN = Amicacina

APB = Agua peptonada bufferada

CAZ = Ceftazidima

CDC = Centers for Disease Control and Prevention

CF = Cefalotina

CIP = Ciprofloxacina

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI = Concentración Mínima Inhibidora

CS = Colistina

CTX = Cefotaxima

ECDC = European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA = European Food Safety Authority

FAO = Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FEP = Cefepima

FSA = Food Standard Agency

FT = Nitrofurantoína

GM = Gentamicina

INCIENSA = Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

INEC = Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

IPM = Imipenem

LIA = Agar Hierro Lisina

MEM = Meropenem

NA = Ácido Nalidíxico

NCP = National Control Programs

OIE = Organización Mundial de la Sanidad Animal

OMS = Organización Mundial de la Salud

R-V = Rappaport-Vassidialis

SAM = Ampicilina/Sulbactam

TSI = Agar Hierro Triple Azúcar

XLT4 = Xilosa-Lisina-Tergitol-4

SXT = Trimetoprim/Sulfamethaxole

SENASA = Servicio Nacional de Salud Animal

TZP = Piperacilina/Tazobactam

WVDL = Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory

Índice de contenidos

Tribunal Examinador	i
Dedicatoria y agradecimientos	ii
Abreviaturas	iv
Índice de contenidos	vi
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1. Generalidades de <i>Salmonella</i> spp.....	1
1.1.2 Patogénesis de <i>Salmonella</i> spp.....	2
1.1.3 Transmisión zoonótica de <i>Salmonella</i>	4
1.1.4 Epidemiología de la salmonelosis en hatos bovinos	5
1.1.5 <i>Salmonella</i> y la resistencia a los antimicrobianos.....	8
1.2 Justificación	10
1.3 Objetivos	17
1.3.1 Objetivo General	17
1.3.2 Objetivos Específicos	17

2. Metodología	18
2.1 Diseño de estudio	18
2.2 Colección, aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	19
2.3 Confirmación fenotípica	20
2.4 Determinación a resistencia antimicrobiana	21
2.5 Análisis de datos	22
3. Resultados	23
3.1. Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en las Regiones Central y Norte de Costa Rica	23
3.1.1 Prevalencia según semana postparto	29
3.2 Características de las producciones	30
3.3 Perfiles de resistencia a antibióticos	35
4. Discusión	37
4.1 Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp.	37
4.2 Manejo en las fincas	40
4.3 Resistencia a antimicrobianos	48
5. Conclusiones	52
6. Recomendaciones	53
7. Fuente de Financiamiento	55
8. Bibliografía	56
9. Anexos	73

Anexo A. Tablas de evaluación de manejo en las fincas.....73

Índice de cuadros

Cuadro 1. Valores de corte de CMI para <i>Enterobacteriaceae</i>	22
Cuadro 2. Características de las fincas muestreadas	34
Cuadro A1. Tabla de análisis de los aspectos: manejo de residuos orgánicos ..	73
Cuadro A2. Tabla de análisis de los aspectos: infraestructura e higiene	74
Cuadro A3. Tabla de análisis de los aspectos: manejo de alimentos y control de plagas	74

Índice de figuras

Figura 1. Gráfico de porcentaje general de aislamientos de <i>Salmonella</i> spp. según región socioeconómica	23
Figura 2. Gráfico de prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. a partir de aislamientos recuperados de heces en finca, según región socioeconómica.	24
Figura 3. Gráfico de porcentaje de aislamientos según región socioeconómica considerando sólo muestras positivas.....	25
Figura 4. Gráfico de prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en cada una de las fincas positivas a partir de aislamientos recuperados de heces.	26
Figura 5. Gráfico de porcentaje relativo por finca del total de muestras positivas.....	27
Figura 6. Mapa del país representando las fincas muestreadas (fincas positivas representadas de color rojo).	28
Figura 7. Gráfico de prevalencia según semana postparto	29
Figura 8. Gráfico de porcentaje muestras positivas a <i>Salmonella</i> spp. de acuerdo con la semana postparto.	30
Figura 9. Gráfico de perfiles de resistencia en muestras positivas a <i>Salmonella</i> spp.....	35
Figura 10. Gráfico de aislamientos monorresistentes de acuerdo con la finca correspondiente.	36

Resumen

La salmonelosis corresponde a una de las enfermedades de mayor propagación a nivel mundial y varios estudios en múltiples países han confirmado a los sistemas de producción como un posible punto de origen de la infección, la cual puede llegar hasta la mesa de los consumidores. A partir de esto y sumado a la falta de información en el estudio de la enfermedad y prevalencia en producción primaria a nivel nacional, se propuso el presente proyecto.

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la prevalencia y perfiles de resistencia a antibióticos de *Salmonella enterica* no tifoidea recuperada de muestras fecales en bovinos de leche durante la etapa de postparto dentro de la Región Central y Huetar Norte del territorio costarricense durante el año 2019. Para cumplir nuestro objetivo, se realizó el muestreo de diez fincas entre las dos regiones para analizar un total de 300 muestras fecales, se incluyeron fincas que se mantuvieran con poblaciones entre los 100 - 180 animales; los animales incluidos en el estudio debían encontrarse entre las primeras tres semanas postparto.

Todas las muestras pasaron por un proceso para detección y aislamiento de *Salmonella enterica* no tifoidea, así mismo a aquellas muestras que resultaron positivas, se les realizó un protocolo para determinación de sensibilidad antibiótica. La prevalencia general obtenida resultó ser de un 6% (18/300), a nivel de región las prevalencias correspondieron a un 7,77% (14/180) en la Región Huetar Norte y un 3,33% (4/120) en la Región Central. En cuanto a la etapa postparto un 44,44% (8/18) de las muestras positivas provinieron de animales dentro de la primera semana postparto, mientras que para la segunda y tercera semana postparto se aisló un 27,77 % (5/18).

De las pruebas de sensibilidad a antibióticos realizadas a los aislamientos, se obtuvo un 72,22% (13/18) de pansusceptibilidad a todos los antibióticos analizados, mientras que un 27,77% (5/18) presentaron monorresistencia a la nitrofurantoína. No se encontraron bacterias parcialmente resistentes ni multirresistencia en ninguno de los aislamientos.

Adicionalmente se realizó una inspección a todas las granjas visitadas para observar diferentes aspectos de manejo, y considerar varios factores predisponentes para cada una de las fincas que podrían generar una influencia sobre la presencia de la bacteria. Con el objetivo de informar a los productores sobre estas inconformidades y realizar las correcciones pertinentes para poder mejorar sus sistemas de producción y de esta forma disminuir o prevenir la presencia de la bacteria en estos.

A partir de este estudio se determinó por primera vez datos relacionados con la prevalencia y resistencia a antibióticos de *Salmonella* spp. en fincas dentro del territorio costarricense, sin embargo, también instamos por un aumento en la escala de futuros estudios no sólo en cuanto a poblaciones, sino también en cuanto a relación de variables que pueden afectar de manera directa la presencia de la bacteria en las explotaciones pecuarias. Con todo esto, será posible tener un panorama amplio de su epidemiología en el país y por ende generar un programa de mitigación con el propósito de asegurar la inocuidad alimentaria desde la granja a la mesa bajo el paradigma de Una Salud.

Abstract

Salmonellosis corresponds to one of the diseases with the greatest spread worldwide and several studies in multiple countries have confirmed production systems as a possible point of origin of the infection, which can reach the consumer's table. Based on this, added to the lack of development in the study of the disease at a national level, the present project was proposed.

The present cross-sectional study aimed to determine the prevalence and antibiotic resistance profiles of non-typhoidal *Salmonella enterica* recovered from fecal samples of postpartum dairy cattle located at the Central and Northern Region of Costa Rica during 2019. For this, a total of 300 fecal samples from ten farms were analyzed. Inclusion criteria considered dairy cows within the 1-3 weeks postpartum from medium size herds of 100 - 180 animals.

All samples were subjected for the detection and isolation of non-typhoid *Salmonella enterica*, and an antibiotic susceptibility profile was carried out to all recovered isolates. The overall prevalence of fecal *Salmonella* was 6% (18/300), with 7.77% (14/180) at the Huetar Norte Region and 3.33% (4/120) at the Central Region. Regarding the postpartum stage, 44.44% (8/18) of the positive samples were obtained from animals within the first postpartum week, and 27.77% (5/18) corresponded to the second and third postpartum weeks.

The antibiotic susceptibility showed a 72.22% (13/18) pansusceptible isolates to all the 15 analyzed antibiotics, while 27.77% (5/18) presented mono resistance to nitrofurantoin. Non intermediate resistant or multi-resistant isolates were found in this study.

Additionally, management practices and biosecurity measures were analyzed in all visited farms considering various predisposing factors that could have influence on the spread

of *Salmonella* between animals and environment. A feedback of findings and corrective measures were provided to all producers in order to improve the management practices and prevention strategies to decrease *Salmonella* prevalence.

The present study offers unique preliminary data related to the prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* on farms in Costa Rica. Larger scale studies are highly recommended to address the impact of production practices that can directly affect the presence of the bacterium in livestock. This type of studies provides an insight of farm practices that could be addressed to mitigate the spread of infectious diseases with animal and human impact under a One Health approach.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1. Generalidades de *Salmonella* spp.

Salmonella es una enterobacteria Gram-negativa, no formadora de esporas, anaerobia facultativa, móvil por sus flagelos peritricos (con excepción de *S. enterica* Gallinarum y Pullorum), fermentadora de glucosa con producción de ácido y gas, incapaz de metabolizar lactosa y con una temperatura óptima de crecimiento entre los 5 °C y 38 °C (Forsythe, 2011). Aislada por primera vez en 1855 por Daniel Salmon (Lenington 1967; Hardy 2015), *Salmonella* está clasificada en dos especies *S. enterica* y *S. bongori* (Forsythe 2011), en donde la primera se divide a su vez en seis subespecies incluyendo *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Tindall 2005) y abarcan aproximadamente 2600 diferentes serovares dependiendo de sus antígenos flagelares (H), capsulares (K) y somáticos (O) (Jajere 2019). Taxonómicamente los serovares se deben escribir con letra mayúscula y no en cursiva. Así, *Salmonella* Enteritidis hace referencia a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Enteritidis (Grimmont y Weill 2007).

La elevada cantidad de serovares está supeditada a la diversidad de hospederos que infecta (Rhen et al. 2007). En términos generales se pueden clasificar en dos grupos, sean los serovares restringidos a humanos, como Typhi y Paratyphi A y B, denominados como *Salmonella* tifoideas y el grupo asociado a infecciones en diversas especies animales conocidas como *Salmonella* no tifoideas, por lo general causantes de variable severidad de trastornos gastrointestinales desde autolimitantes hasta infecciones sistémicas invasivas con alta mortalidad en humanos (Rhen et al. 2007).

1.1.2 Patogénesis de *Salmonella* spp.

La mayoría de las cepas de *Salmonella* tienen la capacidad de invadir, sobrevivir y replicarse en las células de los humanos, y la severidad de la infección depende de la serovariedad de la cepa infectante, el inóculo y de las características del hospedador, incluyendo la edad, el estado fisiológico (Eng et al. 2015) y otros factores como la salud de la microbiota gastrointestinal (Muñoz-Vargas et al. 2018) y el estado inmunológico.

La principal vía de transmisión es el consumo de alimentos contaminados y el contacto directo con animales infectados, provocando generalmente vómito, diarrea o dolor abdominal, así como dolor de cabeza y fiebre. Una vez ingresada la bacteria al organismo, los síntomas pueden llegar a presentarse entre las seis y 48 horas, y durar entre cuatro y siete días (Gideon y Berger 2018). Las principales complicaciones resultan en deshidratación y desbalance electrolítico, de ocurrir bacteremia puede desencadenar en neumonía, meningitis u osteomielitis, y en el peor de los casos puede conllevar a la muerte (Talley 2011).

La salmonelosis causada por serovares no tifoideos puede ser descrita en dos patrones distintos. El primero y más común es un patrón secretor que genera diarrea aguda acuosa (Romero Cabello 2007). En este caso, las bacterias se multiplican en el intestino delgado y penetran la mucosa intestinal, liberando una enterotoxina que provoca la diarrea, atraviesan la lámina propia y generan edema e inflamación (Romero Cabello 2007). Por lo general la bacteria no persiste en el intestino y se considera no invasora (Romero Cabello 2007). Existen casos donde, una vez que el hospedero sufre la gastroenteritis por *Salmonella*, puede convertirse en portador asintomático. En estas situaciones el tracto biliar se mantiene colonizado y libera bacterias al tracto gastrointestinal, los microorganismos pasan por el

intestino sin penetrar el epitelio y los excreta en las heces. Se considera crónico después de un año de estar liberando la bacteria por las heces y es una condición sumamente rara, ocurriendo en 1% de los casos de gastroenteritis aguda (Romero Cabello y Herrera Benavente 2002).

El segundo patrón es el invasor, es un patrón característico de *S. Typhimurium*; sin embargo, otros serovares como *S. Cholerasuis*, *Dublin* u *Oranienburg* pueden seguir este patrón en casos de inmunosupresión, en personas infantiles o adultos mayores. Las bacterias invaden las células epiteliales y una vez que entran a la lámina propia liberan su lipopolisacárido (LPS), el cual actúa como una endotoxina pirógena (Mastroeni y Grant 2011). Utilizando vacuolas, se envuelven para protegerse durante la fagocitosis por medio de macrófagos, estos, a su vez son utilizados como vehículos para generar invasión sistémica (Romero Cabello 2007; Gutiérrez Castillo et al. 2008; Ramos Jiménez 2012). En esta infección sistémica, *Salmonella* viaja a los linfonodos mesentéricos por torrente sanguíneo, las cuales son un sitio importante de crecimiento y diseminación para la bacteria (Webb et al. 2017). Posteriormente pueden dirigirse al hígado, médula ósea, riñón y bazo. En estos órganos las bacterias generan focos de infección discretos, una vez que invaden la zona establecen otros sitios de infección en regiones distantes del mismo órgano, y de esta manera logran evadir el sistema inmunológico del organismo infectado (Mastroeni y Grant 2011).

Los factores de virulencia de *Salmonella* cumplen una gran variedad de roles en la patogénesis de la enfermedad, estos factores se encuentran codificados en grupos de genes localizados en áreas específicas de los cromosomas de la bacteria, llamados islas de patogenicidad (Jajere 2019), siendo algunas de ellas específicas de ciertos serovares (Hensel 2004).

La isla SP-1 es una de las más caracterizadas, se encuentra en todas las especies y serotipos de *S. enterica* (Hensel 2004) y es la que le permite a la bacteria penetrar al epitelio de los organismos y sobrevivir al sistema inmune, esta isla codifica varios componentes del sistema de secreción tipo III, un sistema de proteínas encargadas de interferir o subvertir vías de señalización en la célula infectada, otra isla que hace uso de este sistema es la SP-2; sin embargo esta isla posee una función más de replicación que de invasión para la bacteria (Marcus et al. 2000). La isla SP-7 es la más grande de todas las identificadas hasta el momento y altamente estable en el genoma de las bacterias, sus funciones son inciertas; no obstante, su notoriedad reside en que a partir de esta isla se codifica el antígeno Vi, el cual se ha estado utilizando para el desarrollo de vacunas contra la salmonelosis (Seth-Smith 2008).

1.1.3 Transmisión zoonótica de *Salmonella*.

Los animales de producción como los bovinos, cerdos y aves sirven como reservorios de *Salmonella*, y la infección por consumo de alimentos de origen animal y sus derivados contaminados se consideran la fuente de un alto porcentaje de las infecciones (Wells et al. 2001; Uribe y Suarez 2006). El agua contaminada y el ambiente también pueden ser fuentes de infección, además, la conjuntiva y las vías aéreas pueden llegar a ser rutas de ingreso bajo circunstancias especiales (Nielsen 2013).

Si bien la leche que se comercializa a nivel industrial representa un riesgo mínimo para la salud pública por su pasteurización, hay un riesgo alto en familias que tradicionalmente utilizan leche sin pasteurizar y comercializan productos a partir de ella (Wells et al. 2001; Oliver et al. 2005), además existen productos que por su naturaleza

utilizan leche no pasteurizada como es el caso de quesos. Otra fuente de contaminación del alimento es en plantas de cosecha de animales, donde la carcasa puede llegar a entrar en contacto con materia fecal y no ser eliminada con los métodos tradicionales de desinfección, o bien encontrarse en carne molida que ha utilizado tejidos linfáticos dentro de su producción (Romero Cabello y Herrera Benavente 2002, Muñoz-Vargas et al. 2017). Esto es de agravante preocupación ya que muchos de los subproductos de carne bovina son obtenidos de vacas de leche de descarte o enfermas, consideradas importantes reservorios de *Salmonella*, y las cuales se ha estimado que constituyen aproximadamente el 17% de la carne de res (Wells et al. 2001).

1.1.4 Epidemiología de la salmonelosis en hatos bovinos

1.1.4.1 Salmonelosis en bovinos

En el caso de los bovinos, las infecciones por *Salmonella* se pueden presentar a cualquier edad y llevar un curso clínico agudo o subagudo (Mastroeni y Maskell 2006). La presentación aguda es la más característica, con síntomas como fiebre, depresión, pérdida del apetito, diarrea con deposiciones fétidas y acuosas, inclusive pueden presentar estrías sanguinolentas y mucosidad, así como disminución de la producción de leche y abortos (Barrow y Wallis 2005). Cuadros severos pueden presentar necrosis en el epitelio intestinal y fiebre persistente (Cummings et al. 2010). La excreción de la bacteria se da principalmente por las heces y se considera el principal vehículo de infección, puede ser excretada tan temprano como a las 12-48 horas luego de la ingestión y puede mantenerse hasta meses o años excretando intermitentemente, a estos animales se les considera persistentemente

infectados. La orina, leche, saliva y descargas vaginales también pueden ser utilizados como vehículos por la bacteria (Nielsen 2013).

Los brotes de *Salmonella* pueden llegar a provocar grandes pérdidas a los productores ya que conllevan a altos costos de tratamiento, además del incremento en mortalidad del hato. Las infecciones por esta bacteria inclusive pueden llegar a ser subclínicas y mantenerse por largos períodos, esto representa un riesgo en cuanto a seguridad alimenticia, pues el animal puede llegar al matadero con la capacidad de transmitir la bacteria sufriendo la enfermedad sin mostrar signos clínicos (Fossler et al. 2005).

Existen muchos factores, tanto biológicos como sociales, que pueden permitir a la salmonelosis convertirse en un problema a nivel de hato. Por ejemplo, el crecimiento de la población humana globalmente ha requerido que se dé una intensificación de la cría de animales y aumento en su estabulación por lo que el tamaño del hato se ha identificado como uno de los factores de riesgo más consistentes en la ecología de este patógeno (Fossler et al. 2005).

Otros factores importantes son las deficiencias en infraestructura, administración o bioseguridad de las fincas, incluyendo la falta de instalaciones para el aislamiento de animales enfermos o bioinfecciosos, compra de animales a comerciantes de manera indiscriminada, estabulación y deficiente manejo de desechos orgánicos, y falta de control de animales silvestres y pestes (ratas, aves, insectos) tanto dentro de las instalaciones de la granja como en las zonas de almacenamiento de alimentos (Fossler et al. 2005).

1.1.4.2 El periodo de transición en vacas lecheras y enfermedades metabólicas e infecciosas asociadas

El periodo de transición en vacas lecheras corresponde a las tres semanas antes y las tres semanas después del parto (Drackley 1999; Esposito et al. 2014; Sundrum 2015). Durante esta etapa, las vacas sufren un balance energético negativo y estrés metabólico debidos a un aumento en las necesidades energéticas y de nutrientes (por el inicio de la lactancia) y a una disminución del consumo de alimento, que es normal durante la transición. Este balance energético negativo estimula la movilización de ácidos grasos no esterificados (AGNES) y por consiguiente una acumulación de beta-hidroxibutirato en la sangre (Wankhade et al. 2017). Este factor se puede ver acentuado en animales de mayor rendimiento lo cual los hace más susceptibles a sufrir enfermedades en caso de no ser tratados adecuadamente (Gross et al. 2011).

De no lograrse un adecuado manejo del balance energético negativo, los bovinos en transición pueden sufrir de enfermedades metabólicas como la cetosis, el hígado graso, y otras como la retención de placenta (Esposito et al. 2014; Sundrum 2015). Enfermedades como el hígado graso o la cetosis pueden afectar más allá de las tres semanas posparto con serias repercusiones, por ello se considera que la etapa de transición es crítica y define a futuro la eficiencia productiva y reproductiva del animal. (Wankhade et al. 2017).

La inmunosupresión asociada a la transición ha sido asociada a una mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas sistémicas o localizadas como mastitis o metritis (Beñaldo Fuentes 2012). En otros países, se ha reportado un aumento en la

eliminación de *Salmonella* en heces, principalmente alrededor del parto de vacas lecheras (Digianantonio 2013, Muñoz-Vargas et al. 2018).

1.1.5 *Salmonella* y la resistencia a los antimicrobianos

Salmonella tiene la capacidad de variar genéticamente y sufrir alteraciones asociadas a la pérdida parcial o completa de la eficacia antibiótica generada por resistencia, la cual se puede describir de 2 tipos, intrínseca o adquirida (Forbes 2009).

La resistencia intrínseca se da como resultado de las características del estado genético, fisiológico o estructural normal de la célula bacteriana, se considera natural y heredable, asociada a géneros, especies o grupos bacterianos específicos, es una resistencia predecible, por lo que es útil para determinar perfiles de resistencia y determinar el uso de fármacos como tratamiento a agentes específicos (Forbes 2009).

Por su parte, la resistencia adquirida se refiere a los cambios estructurales o fisiológicos que la bacteria desarrolla a partir de cambios en su composición genética habitual. Se considera imprevisible y es por esto la importancia del uso de métodos laboratoriales para la caracterización de la resistencia de cada aislamiento en el diagnóstico clínico (Forbes et al. 2009).

Las bacterias son capaces de incorporar genes provenientes de otra bacteria a su propio genoma por medio de transferencia horizontal, y con ello desarrollar características de resistencia que anteriormente estaban ausentes. Esta transferencia propicia recombinación genética que puede ser homóloga o legítima, en la cual el ADN tanto del donador como del

receptor tienen alta similitud; o heteróloga o ilegítima, donde se da la introducción de genes nuevos entre secuencias de ADN diferentes (Romero Cabello 2007).

La recombinación genética se puede dar mediante tres mecanismos, el primero consiste en la toma de ADN de bacterias desintegradas en el medio ambiente por parte de bacterias hereditariamente competentes, este fenómeno es conocido como transformación (Montoya Villafane 2008). El segundo mecanismo es el de la transducción y consiste en el transporte de ADN bacteriano hacia una nueva bacteria hospedera, mediante la infección con un virus bacteriófago. Por último, cuando se crea un puente mediante estructuras llamadas pilis sexuales entre dos bacterias y se intercambia material genético ocurre la conjugación (Montoya Villafane 2008).

Particularmente con *Salmonella*, desde 1960 se reportaban ya casos de deficiente susceptibilidad a antibióticos en aislamientos monorresistentes a tetraciclinas. En Alemania un estudio comparativo entre 1961 y 1970 observó el aumento de las cepas de *Salmonella* resistentes, nuevamente describiendo monorresistencia a las tetraciclinas. A partir de 1970 se empezaron a realizar estudios que revelaban multirresistencia a tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol y kanamicina (Wray y Wray 2000). Un estudio retrospectivo en 1979 en Holanda evidenció un aumento de la resistencia de *Salmonella* ante las tetraciclinas y su posterior disminución gracias a su prohibición como promotor de crecimiento.

Si bien la trimetoprim-sulfa y la amoxicilina son antibióticos de amplio espectro que se utilizan como terapia inicial, las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de espectro extendido, se han considerado como los antimicrobianos de elección para el tratamiento de

la salmonelosis clínica grave en personas inmunosupresas y en niños (Jiménez 2012; Martínez 2017).

Durante los primeros años de uso de las fluoroquinolonas se observó poco efecto en la ocurrencia de resistencia por parte de infecciones alimenticias por *Salmonella*. Sin embargo, en países donde se dio la autorización del uso de este antibiótico para animales de consumo se observó un aumento de infecciones resistentes en animales y su presencia en alimentos, posteriormente observándose la resistencia en infecciones humanas (WHO 2004).

En cuanto a la presencia de cepas multirresistentes, *Salmonella* Typhimurium DT104 descubierta a finales de los años 80 ha sido considerada una de las más resistentes, asociada a enfermedades en humanos y ganado, con resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycinas, sulfonamidas y tetraciclinas (AmCmStSuTe), esta serie de resistencias se encuentran en su ADN en un conglomerado denominado como isla genómica de *Salmonella* 1 (SGI1) (Velge et al. 2005) detectada también en *S. Albany*, *S. Newport* y *S. Agona* (Velge et al. 2005). Durante los años 90, *Salmonella* Typhimurium DT104 se propagó a nivel mundial convirtiéndose en la cepa mayormente aislada en múltiples países y reportada en la mayoría de las especies de animales domésticos (Leekitcharoenphon et al. 2016).

1.2 Justificación

Las enfermedades de transmisión alimentaria son consideradas un área de prioritaria atención para la salud pública. Específicamente, *Salmonella*, es el agente bacteriano mayormente asociado a hospitalizaciones y muertes por el consumo de alimentos contaminados en Estados Unidos (Scallan et al. 2011), el segundo en la Unión Europea

(EFSA and ECDC 2016) y está descrito como uno de los tres principales causantes de hospitalizaciones por gastroenteritis bacterianas a nivel mundial. La salmonelosis se considera causante de 93 millones de infecciones entéricas mundialmente por año asociadas a 155 mil muertes (McDermott et al. 2018), y se estima que se pierden cuatro millones de años de vida ajustados por discapacidad globalmente (Havelaar et al. 2015). Una amplia variedad de alimentos ha sido descrita como fuente de transmisión en humanos, incluyendo aquellos derivados de proteína animal, en donde los subproductos bovinos juegan un papel relevante.

A nivel mundial los reportes de brotes asociados a serotipos como como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* van en aumento mundialmente (Gutiérrez-Castillo et al. 2008) y el impacto económico asociado a la salmonelosis es considerable. Por ejemplo, en Dinamarca se ha estimado que el costo por infección asciende a 15.5 millones de dólares anuales, aunado a costos de implementación de programas de control y erradicación de la infección en animales de producción con un costo anual de 14.1 millones de dólares, y pérdidas de 25.5 millones de dólares por incumplimiento laboral y tratamientos (Wegener et al. 2003). Desafortunadamente, países en desarrollo difícilmente presentan datos sobre las pérdidas a causa de las enfermedades transmitidas por los alimentos, específicamente hay una carencia de información sobre costos asociados a salmonelosis alimentaria o a pérdidas de producción.

El estudio de la epidemiología y ecología de *Salmonella* en todas las etapas de la cadena de producción es vital para poder desarrollar métodos de control y prevención, tanto a nivel de producción primaria como postcosecha y manufacturación de alimentos derivados de reservorios animales y ambiente, esto ha permitido que se evidencien importantes factores de riesgo, y partir de ellos poder disminuir el impacto para la salud pública

Por ejemplo, en un estudio de caso control se logró evidenciar como la presencia de *Salmonella* Newport resistente a antibióticos fue mayor en personas que recientemente visitaron, vivieron o trabajaron en granjas previo a la infección (Gupta et al. 2003). Además, se ha reportado que *Salmonella* utiliza al ganado lechero como reservorio, lo cual ha provocado una mayor atención a las explotaciones ganaderas para la detección de la bacteria y de esta manera impedir la propagación de brotes a futuro. De acuerdo con el Centro de Prevención y Control de enfermedades de Estados Unidos (CDC), 36 brotes en ganado bovino lechero fueron causados por *Salmonella* Heidelberg durante el año 2017, encontrando cepas multirresistentes (CDC 2017).

Otro estudio realizado en California, entre los años 2002-2016, donde se recolectaron muestras de heces en vacas lecheras, se observó una prevalencia del 2,64% de *Salmonella*, estas muestras provenían de animales con signos clínicos o asintomáticos. Los serovares circulantes incluían a *S. Newport* y *S. Dublin* en el 21,50% y 19% de las cepas recuperadas respectivamente (Davidson et al. 2018).

Factores de inmunosupresión relacionados a la etapa de transición en el ganado han sido vinculados con el aumento de la prevalencia de *Salmonella* en fincas lecheras. Un estudio longitudinal conducido en Estados Unidos en el 2015 muestra una prevalencia general de *Salmonella* en ganado de transición de un 43%, evidenciando un pico de animales positivos alrededor del parto, principalmente durante la primera semana postparto, alcanzando un 52%. El mismo relaciona este aumento de prevalencia con el estrés metabólico medido por niveles aumentados de BHBA y NEFA (Digianantonio 2015).

En el caso de la Unión Europea, el Centro de Prevención y Control de Enfermedades Europeo (ECDC), genera reportes constantes sobre la epidemiología de la bacteria tanto en humanos como en animales en sus países asociados. Durante el 2015, esta institución reportó más de 94 mil casos de *Salmonella* en humanos, siendo *S. Enteritidis* el serovar más común, seguido por *S. Typhimurium*, *S. Infantis* y *S. Stanley*, un 0,20% de los casos se asociaron a carne bovina contaminada. En animales, específicamente bovinos, se detectó una prevalencia del 2,10%, siendo también *S. Typhimurium* y *S. Derby* los serovares más aislados. También se detectó una contaminación del alimento para bovinos en el 1,20% de las muestras analizadas (EFSA and ECDC 2016).

En cuanto a Costa Rica, la información actual sobre la presencia de *Salmonella* en humanos más allá de los reportes emitidos por el INCIENSA es escasa; sin embargo, en los años recientes ha habido un incremento en la diseminación de información por parte del gobierno, con el fin de concientizar a la población y a las entidades de salud sobre la problemática que representa la enfermedad. Dentro de los reportes sobre salmonelosis de origen alimentario de la última década, se han incluido los resultados de la vigilancia de diarreas asociadas a *Salmonella Weltevreden*, en donde se reportaron 32 aislamientos y su resistencia al grupo de las sulfonamidas (Bolaños et al. 2012).

Otros reportes han evidenciado la diversidad de serovariedades que han sido aisladas tanto de origen humano como de origen animal, así como aquellas que se originaron de alimentos contaminados. En el 2013, el laboratorio de referencia nacional INCIENSA logró identificar un total de 34 serovariedades diferentes en 235 aislamientos, de origen intestinal y extraintestinal. De estos aislamientos 112 representaron salmonelosis de origen no humano siendo 27 de ellos aislados de alimentos de origen animal. Dentro de las serovariedades más

frecuentes se incluyen *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Panama* en humanos, y *S. Enteritidis*, *S. Alachua*, *S. Rissen*, *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Mbandaka* y *S. Javiana* en alimentos (Bolaños et al. 2014).

Por su parte, la epidemiología de la salmonelosis en humanos ha sido reportada a nivel nacional. Según un boletín estadístico sobre enfermedades de declaración obligatoria del Ministerio de Salud del 2015, se reportaron 210 casos de salmonelosis en humanos y se estimó una tasa de incidencia de 4,35% por cada cien mil habitantes, siendo los menores de un año la población más vulnerable, en donde se estimó la mayor incidencia de salmonelosis en las provincias de Heredia y Puntarenas, principalmente debido a los casos confirmados en los cantones Montes de Oro de Puntarenas y Sarapiquí de Heredia (Ministerio de Salud 2016).

En cuanto a la resistencia a los antibióticos, actualmente tanto en medicina humana como veterinaria representa una gran problemática y ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (WHO) como uno de los mayores problemas emergentes en la salud pública (Wray and Wray 2000). Esta problemática se asoció principalmente al uso de los antibióticos como aditivos en el alimento de los animales, a su uso en la medicina humana y sobreuso en especies de producción, siendo las fluoroquinolonas y los betalactámicos los principales medicamentos a los que se generó resistencia (Wray and Wray 2000). Se estima que para el 2050 las infecciones resistentes a antibióticos llegarán a causar 300 millones de muertes prematuras, generando un costo de hasta 100 trillones de dólares (Munita y Arias 2016).

Este un incremento de la resistencia a los antibióticos ha sido evidenciado ampliamente a nivel global. En una investigación realizada en diez países de la Unión Europea durante el período 2000-2004 se comprobó un aumento en la resistencia del 57% al 66% a once antibióticos diferentes, siendo el ácido nalidíxico el medicamento con el aumento de la resistencia más significativa por parte de *S. Enteritidis* (Calderón et al. 2012).

La presencia de multirresistencia a los antibióticos y la gran cantidad de reportes a nivel internacional que hacen evidencia de ello resulta alarmante. Estudios previos han detectado hasta un 50,80% de multirresistencia antimicrobiana en *Salmonella*, incluyendo la resistencia a la combinación de amoxicilina con ácido clavulánico, cefoxitin, ceftiofur, ceftriaxona, cloranfenicol, estreptomycin y tetraciclina (Davidson et al. 2018), evidenciando la no efectividad de medicamentos considerados drogas de elección para el tratamiento de la salmonelosis en poblaciones inmunocomprometidas.

En Australia un estudio del 2017 reportó la emergencia de nuevos genes de resistencia no identificados anteriormente en cepas de *S. Typhimurium*, los cuales han sido asociados con resistencia a cefalosporinas de tercera generación, característica que se consideraba poco común anteriormente. Se sospecha que el origen de esta resistencia proviene del ganado lechero debido a usos extra-etiqueta para tratar el estado de flemón interdigital en el país (Sparham et al. 2017).

En Costa Rica, los reportes referentes a la prevalencia y epidemiología de *Salmonella* y su resistencia antimicrobiana en poblaciones de animales de abasto, ambiente, vida silvestre y diarreas humanas no confirmadas son escasos. Se han visto perfiles de resistencia con sensibilidad disminuida hacia la ciprofloxacina y resistencia al

trimetoprim/sulfamethoxazole (Bolaños et al. 2014), mismo fenómeno observado en cepas aisladas de bovinos, alimentos para consumo humano y casos clínicos (INCIENSA 2014).

En el área de animales silvestres a nivel nacional dos estudios analizan la prevalencia y resistencia antimicrobiana en especies altamente cercanas a los humanos, siendo los mapaches y los geckos respectivamente, en el primer estudio la prevalencia obtenida en poblaciones de mapaches correspondió al 49%, donde se detectaron varias cepas comunes en humanos, por último, la resistencia encontrada correspondió al 7%, siendo el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina los antibióticos donde se encontró resistencia (Baldi et al. 2019). El segundo estudio encontró una prevalencia general del 4.30% en geckos caseros, si bien no encontraron resistencia en antibióticos frecuentemente usados en humanos, el 50% de las muestras evidenció resistencia intermedia a la estreptomicina y sulfonamidas (Jiménez et al. 2015). Ambos estudios hacen un llamado al incremento en el estudio y monitoreo de la bacteria y su relación con los animales estudiados con el propósito de prevenir la diseminación de la enfermedad en humanos, así como la resistencia antibiótica.

Para que Costa Rica pueda afrontar la creciente problemática que genera la salmonelosis y su resistencia a los antibióticos en cuanto a la salud pública, la cual se ha visto reflejada a nivel mundial, es necesario que se fortalezcan las medidas preventivas y de control desde una perspectiva interdisciplinaria. Para cumplir este cometido es de suma importancia generar datos actualizados y robustos a partir de estudios epidemiológicos y ecológicos de la *Salmonella* circulante en el país y sus genes de resistencia a antimicrobianos. A partir de todo lo mencionado anteriormente se resalta la importancia de este estudio en hatos bovinos de Costa Rica, específicamente en vacas lecheras postparto. Estos animales, los cuales sirven de reservorios para la bacteria por contacto directo o indirecto, y al mismo tiempo son fuente de

leche y carne para consumo humano, poseen una alta relevancia en la transmisión de la *Salmonella*, principalmente cuando nos referimos a enfermedades de origen alimentario o por salud ocupacional. Tomando en cuenta lo anterior, además de la escasa información sobre la epidemiología de *Salmonella* spp. en hatos bovinos de Costa Rica, se evidencia que el presente estudio, posee un alto impacto para el desarrollo de la salud pública en el país.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

1.3.1.1 Determinar la prevalencia y perfiles de resistencia a antibióticos de *Salmonella* no tifoidea recuperada de bovinos de leche durante la etapa de postparto dentro de la Región Central y Huetar Norte del territorio costarricense.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Determinar la prevalencia de *Salmonella* en heces recuperadas de vacas lecheras durante la etapa postparto dentro de la Región Central y Huetar Norte del territorio costarricense durante el año 2019.

1.3.2.2 Identificar fenotípicamente los perfiles de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *Salmonella* obtenidos.

2. Metodología

2.1 Diseño de estudio

En este estudio transversal observacional se incluyeron 300 vacas en posparto temprano (uno a 30 días) en etapa de transición, provenientes de hatos lecheros especializados costarricenses en pastoreo, que tuvieran de 100 a 180 vacas en ordeño, y localizados en las regiones Central y Huetar Norte de Costa Rica. Como criterios de inclusión adicionales se tuvo en cuenta que los hatos tuvieran instaurado y actualizado la aplicación para control y la gestión de la producción VAMPP (Veterinary Automated Management Production and control Program) de la Universidad Nacional, que formaran parte de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L.; y que tuvieran un programa activo de vacunación. La firma de un consentimiento informado por parte de sus propietarios se consideró obligatorio para la inclusión de los hatos. Este estudio contó con el aval de la Comisión de Bienestar Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, según el acuerdo 003 de la sesión ordinaria 003-2019.

El tamaño de muestra (n) se calculó con la fórmula de Canon y Roe (Canon and Roe 1982), para detección de enfermedad considerando una población estimada de 242000 (N) vacas lecheras costarricenses (INEC 2015), un error del 2.5% con un 95% de confianza, un 99% de especificidad y sensibilidad en la técnica de cultivo en el laboratorio, y una prevalencia esperada de *Salmonella* en heces de 6%, basados en muestreos preliminares llevados a cabo en algunas fincas costarricenses. Aproximadamente 300 vacas provenientes de diez hatos (30 vacas por hato) fueron seleccionadas aleatoriamente considerando que se encontrarán en el periodo de transición posparto (1-30 días), sin tratamiento de antibióticos

y clínicamente sanas. Las visitas a cada hato fueron realizadas varias veces hasta alcanzar el número de muestras propuesto. Con la fórmula utilizada se tuvo la certeza de que la finca presentaría muestras positivas en el caso de que la bacteria estuviera circulando, o que, de otro modo, de no haber resultados positivos, sería porque la prevalencia era más baja de la mínima esperada. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa epidemiológico WinEpi (de Blas 2006).

2.2 Colección, aislamiento e identificación de *Salmonella*.

Todas las muestras fecales fueron recolectadas directamente del recto utilizando un guante para inspección ginecológica nuevo para cada animal, y luego fueron colocadas en bolsas estériles, transportadas con hielo hasta el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica, y almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento.

El cultivo bacteriano utilizó el protocolo anteriormente descrito por Muñoz-Vargas y colaboradores (2018) con algunas modificaciones. Brevemente, 4 mg de cada muestra de heces fueron colocados en 36 mL de caldo de tetrionato (TTB, BD Difco™, USA), al cual se le agregaron 720 µL de yoduro de potasio y yodo, siguiendo una incubación a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se añadieron 100 µL de cada muestra en 10 ml de caldo de Rappaport-Vassiliadis (R-V, BD Difco™, USA) y se incubó a 42 °C durante 24 h. Por último, cada inóculo fue transferido individualmente a una placa de agar Xilose-Lysine-Tergitol-4 (XLT4, BD Difco™, USA), seguido de una incubación a 37 °C las cuales fueron evaluadas a las 24 y 48 h (Muñoz-Vargas et al. 2018). En todos los ensayos se tuvieron como controles

las cepas de *S. Abaetetuba* como control H₂S positivo, *S. Cholerasuis* como H₂S negativo y *Escherichia coli* como control negativo.

2.3 Confirmación fenotípica

Una vez que las muestras fueron cultivadas en agar XLT4, las colonias con características compatibles con *Salmonella* spp., se colocaron en tubos de ensayo conteniendo agares Triple-Hierro-Azúcar (TSI, BD Difco™, USA) y Lisina-Hierro (LIA, BD Difco™, USA) con el propósito de realizar una confirmación bioquímica a 35°C por 24h. Para que las muestras generaran un perfil bioquímico compatible, en el tubo de TSI la parte superior debió generar una reacción alcalina y en la inferior una ácida (K/A), mientras que en el en LIA se debió generar una reacción alcalina en todo el tubo (K/K), con producción de H₂S en ambos tubos (Forbes 2009) una vez esto fuera verificado se confirmaron serológicamente mediante una prueba de aglutinación, utilizando un antisuero polivalente contra *Salmonella* spp.(Denka Seiken Ltd., JP).

Por último, se les realizó identificación bioquímica completa por medio del sistema confirmación automatizado VITEK® 2 (Biomérieux, Inc., FR.) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, cada aislamiento fue suspendido en 3mL de solución salina estéril hasta alcanzar una densidad de 0.5 en la escala de McFarland utilizando el instrumento DensiCheck 2 (Biomérieux, Inc., USA.). Estas suspensiones fueron inoculadas en las tarjetas VITEK® 2 GN (Biomérieux, Inc., USA) y se incubaron en el equipo Vitek, Los aislamientos confirmados se inocularon en un caldo de tripticasa de soya (BD Difco™, USA) con glicerol dentro de crioviales y fueron congelados a -80 °C para futuros estudios (Callaway et al. 2005).

2.4 Determinación a resistencia antimicrobiana

La determinación de la resistencia antimicrobiana de cada muestra fue realizada mediante el uso del sistema automatizado VITEK[®] 2 (Biomérieux, Inc., FR) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Los aislamientos identificados como *Salmonella* y fenotípicamente confirmadas fueron suspendidos en 3 mL de solución salina estéril en tubos de ensayo hasta alcanzar una densidad de 0.5 en la escala de McFarland por medio de medición con el instrumento DensiCheck 2 (Biomérieux, Inc., USA). De cada suspensión se colectaron posteriormente 145 µL y se inocularon en otros 3 mL de solución salina estéril. Finalmente dicha suspensión se inoculó en las tarjetas Vitek[®] 2 AST-N279 (Biomérieux, Inc., USA), estas tarjetas analizan los antimicrobianos Ampicilina (AM), Ampicilina/Sulbactam (SAM), Piperacilina/Tazobactam (TZP), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefepima (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Amicacina (AN), Gentamicina (GM), Ácido nalidíxico (NA), Ciprofloxacino (CIP), Nitrofurantoína (FT), Colistina (CS) y Trimetroprim/Sulfametoxazol (SXT). Las tarjetas se incubaron en el equipo Vitek y posteriormente se realizó la interpretación de los resultados de acuerdo con la guía del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2020).

Los resultados a la prueba de resistencia a antimicrobianos de los aislamientos fueron categorizados como susceptibles o resistentes, donde en este último se incluyen aquellos que se clasificaran como resistentes o de resistencia intermedia basándose en los valores de corte de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) para *Enterobacteriaceae* de la guía del CLSI, 2020, según el Cuadro 1.

Cuadro 1. Valores de corte de CMI para *Enterobacteriaceae*

Antibiótico	Referencia	Criterios de interpretación		
		Susceptibles		Resistentes
		Susceptible	Intermedio	Resistente
Ampicilina	CLSI (2020) ^a	≤ 8	16	≥ 32
Ampicilina/Sulbactam	CLSI (2020) ^a	≤ 2	---	≥ 2
Piperacilina/Tazobactam	CLSI (2020) ^a	≤ 4	8	≥ 16
Cefotaxima	CLSI (2020) ^a	≤ 1	2	≥ 4
Ceftazidima	CLSI (2020) ^a	≤ 4	8	≥ 16
Cefepima	CLSI (2020) ^a	≤ 2	4-8	≥ 16
Imipenem	CLSI (2020) ^a	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	CLSI (2020) ^a	≤ 1	2	≥ 4
Amicacina	CLSI (2020) ^a	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicina	CLSI (2020) ^a	≤ 4	8	≥ 16
Ácido nalidíxico	CLSI (2020) ^a	≤ 16	---	≥ 32
Ciprofloxacino	CLSI (2020) ^a	≤ 0.5	---	≥ 1
Nitrofurantoína	CLSI (2020) ^a	≤ 32	64	≥ 128
Trimetoprim/Sulfametoxazol	CLSI (2020) ^a	≤ 40	---	≥ 80

^a Clinical and Laboratory Standards Institute

2.5 Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo de las frecuencias y proporciones de muestras positivas a *Salmonella* en vacas lecheras durante el primer mes posparto. La prueba de Chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según tamaño de frecuencias obtenidas, fueron utilizadas para calcular medidas de asociación utilizando el programa estadístico Minitab 17® (Minitab 2010). Valores $p < 0.05$ fueron considerados como significativos en todas las comparaciones.

3. Resultados

3.1. Prevalencia de *Salmonella* spp. en las Regiones Central y Norte de Costa Rica

Rica

Un total de 300 muestras de heces fueron recolectadas de diez fincas (180 muestras provenientes de la Región Norte y 120 muestras de la Región Central, con 30 muestras por cada finca) para aislamiento de *Salmonella enterica* no tifoidea.

La prevalencia total obtenida de *Salmonella* spp. fue del 6% (18/300), encontrándose en el 50% de las fincas muestreadas (5/10). De las 300 muestras procesadas, un 4,60% (14/300) de muestras positivas correspondieron a la Región Huetar Norte, mientras que un 1,33% (4/300) se obtuvieron de la Región Central (Figura 1).

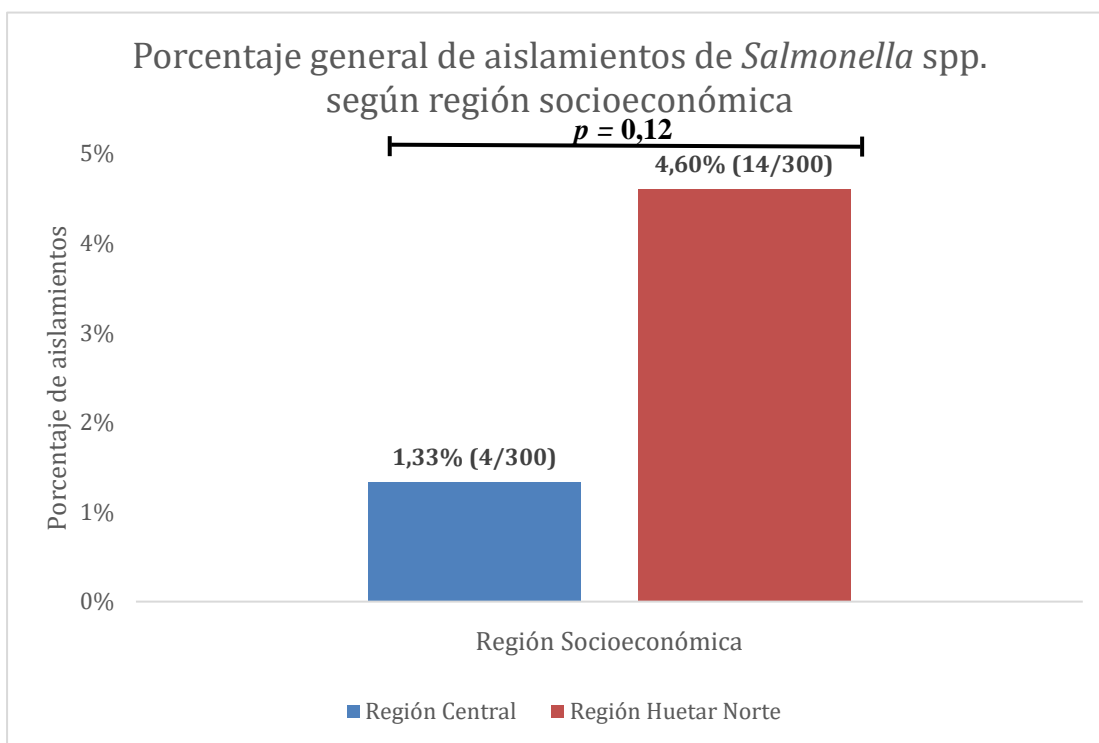


Figura 1. Gráfico de porcentaje general de aislamientos de *Salmonella* spp. según región socioeconómica

La prevalencia desglosada según las muestras colectadas para cada región correspondió a un 7,77% (14/180) en la zona Norte y un 3,33% (4/120) de la de la zona Central. A pesar de que existe una diferencia numérica entre ambas regiones, no se encontró una diferencia estadística en la variable “región” y la aparición *Salmonella* spp. según la prueba de Fisher ($p=0,12$), de igual manera no hubo una diferencia significativa entre las prevalencias de las regiones (Figura 2).

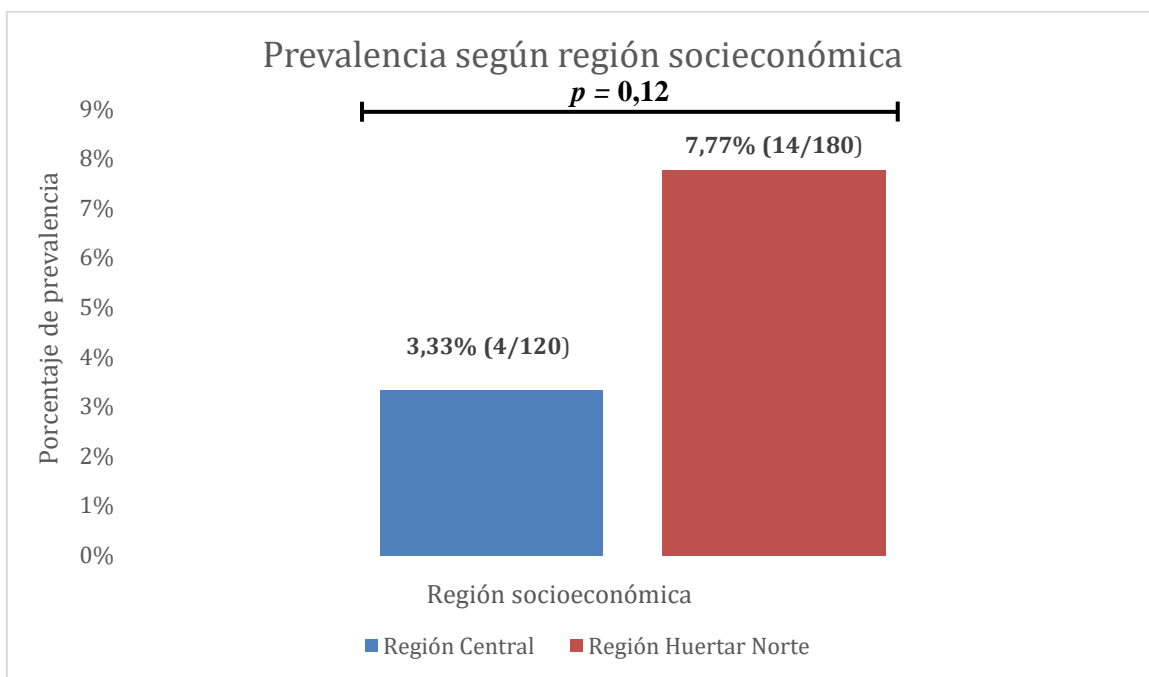


Figura 2. Gráfico de prevalencia de *Salmonella* spp. a partir de aislamientos recuperados de heces en finca, según región socioeconómica.

Así, del total de muestras positivas, 77,77% (14/18) provienen de la Región Huetar Norte y un 22,22% (4/18) de la Región Central (Figura 3).

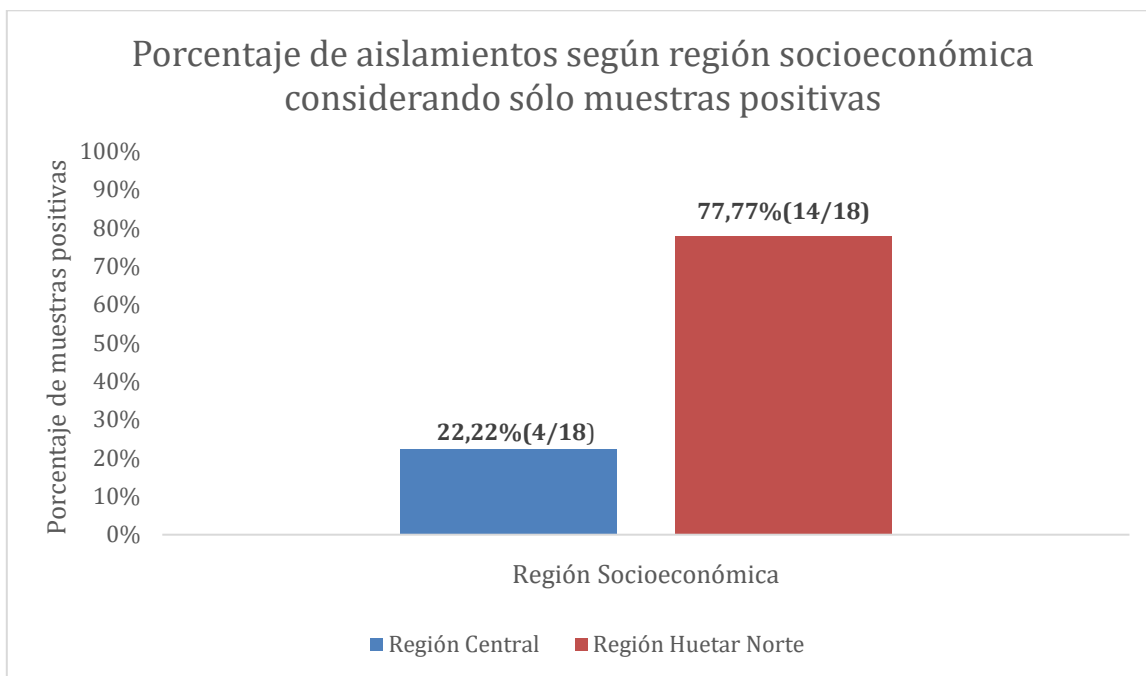


Figura 3. Gráfico de porcentaje de aislamientos según región socioeconómica considerando sólo muestras positivas.

En total se obtuvieron cinco fincas negativas y cinco fincas positivas, estas últimas correspondientes a los números 1, 2, 3, 5 y 9. Analizando la prevalencia de cada una de las fincas positivas, la finca 1 presentó una prevalencia del 16% (5/30), la finca 2 un 3,33% (1/30), la finca 3 un 9,99% (3/30), la finca 5 un 6,66% (2/30) y la finca 9 un 23,33% (7/30). No se encontró ninguna relación estadística significativa entre las fincas y la presencia de la bacteria ($p = 0,39$). Sin embargo, al hacer comparaciones entre cada una de las fincas, se encontró una diferencia significativa entre las fincas 2 y 9 ($p = 0,049$). (Figura 4).

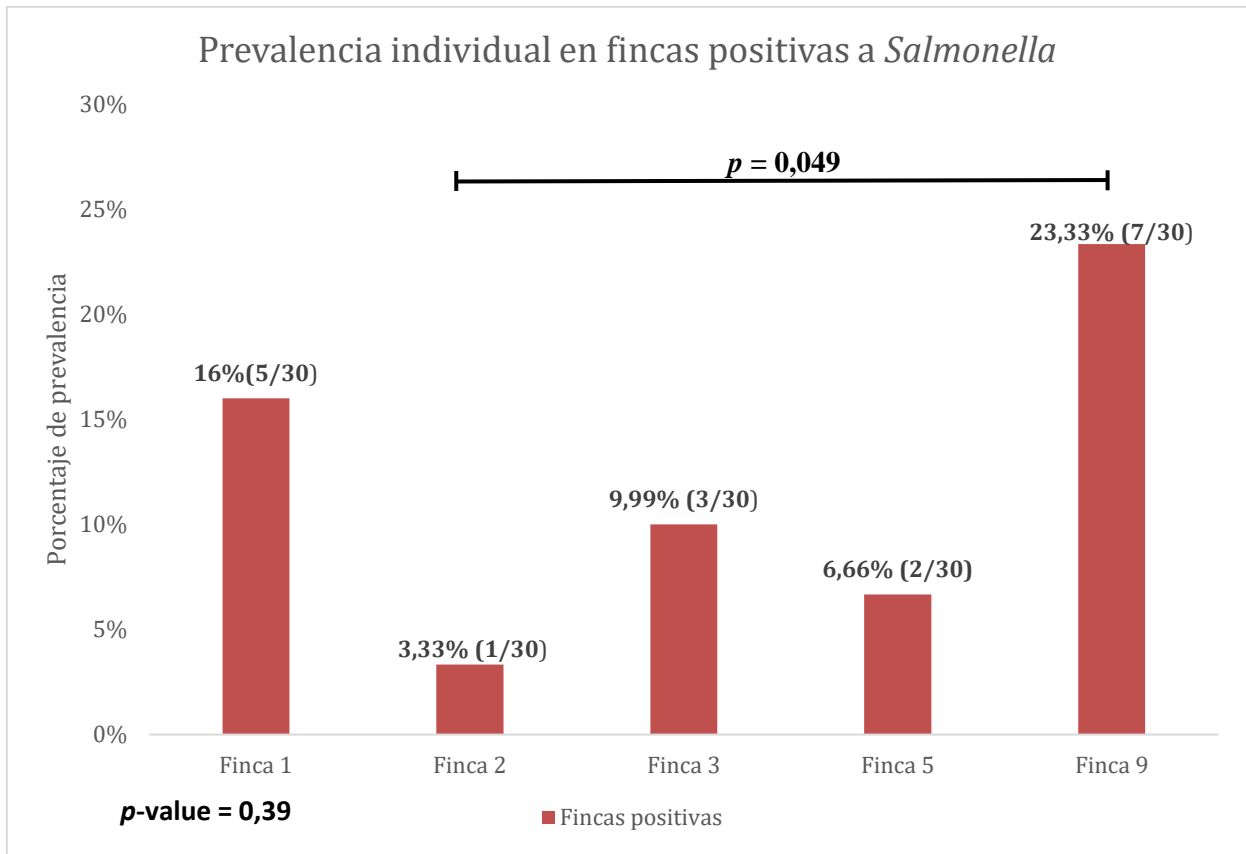


Figura 4. Gráfico de prevalencia de *Salmonella* spp. en cada una de las fincas positivas a partir de aislamientos recuperados de heces.

Tomando en cuenta únicamente los aislamientos recuperados, el 27,77% (5/18) corresponden a la finca 1, 5,55% (1/18) a la finca 2, 16,66% (3/18) a la finca 3, 11,11% (2/18) a la finca 5 y 38,88% (7/18) a la finca 9. (Figura 5).

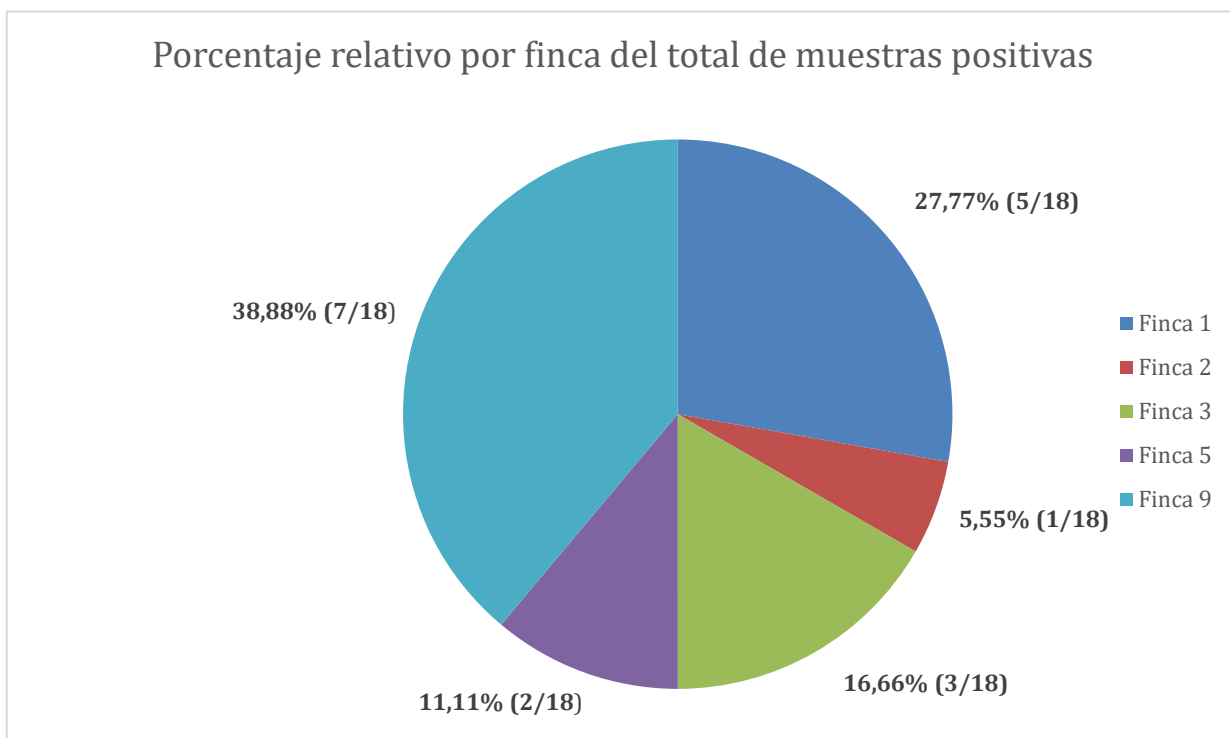


Figura 5. Gráfico de porcentaje relativo por finca del total de muestras positivas

De las fincas positivas, tres hatos pertenecen a la Región Huetar Norte y dos a la Región Central del país. Todas las fincas muestreadas se encuentran representadas en la Figura 6, siendo las positivas marcadas color rojo.

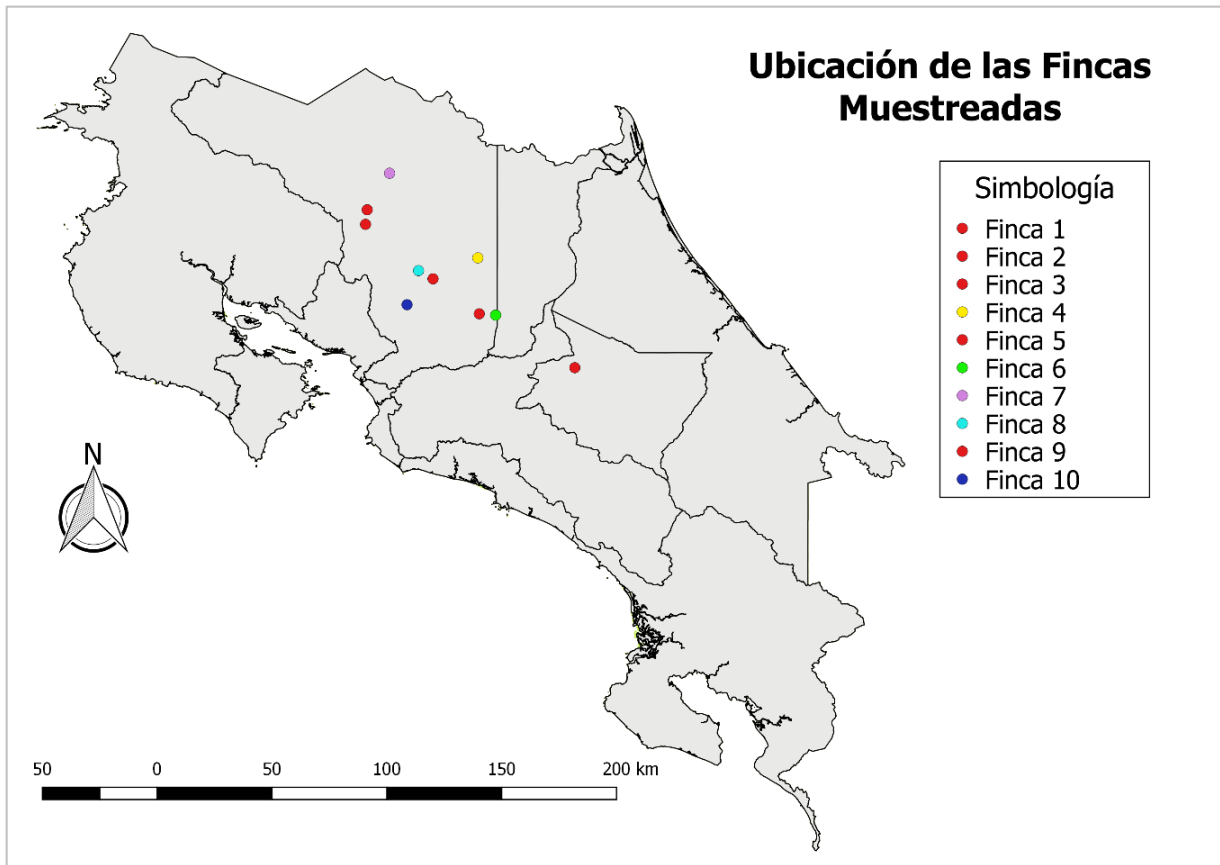


Figura 6. Mapa del país representando las fincas muestreadas (fincas positivas representadas de color rojo).

3.1.1 Prevalencia según semana postparto

Tomando en cuenta las semanas postparto incluidas en el estudio, un 7,40% (8/108) de las muestras pertenecientes a la semana uno resultaron positivas, representando un 44% (8/18) de los aislamientos positivos, en cuanto a la segunda semana se obtuvo un 4,50% (5/110) de aislamientos, siendo un 27,77% (5/18) de las muestras positivas, por último en la semana tres se obtuvo un 6% (5/82) de positividad, representando un 27,77% de las muestras aisladas, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas estadísticamente (prueba de Fisher, $p = 0.65$) (Figuras 7 y 8).

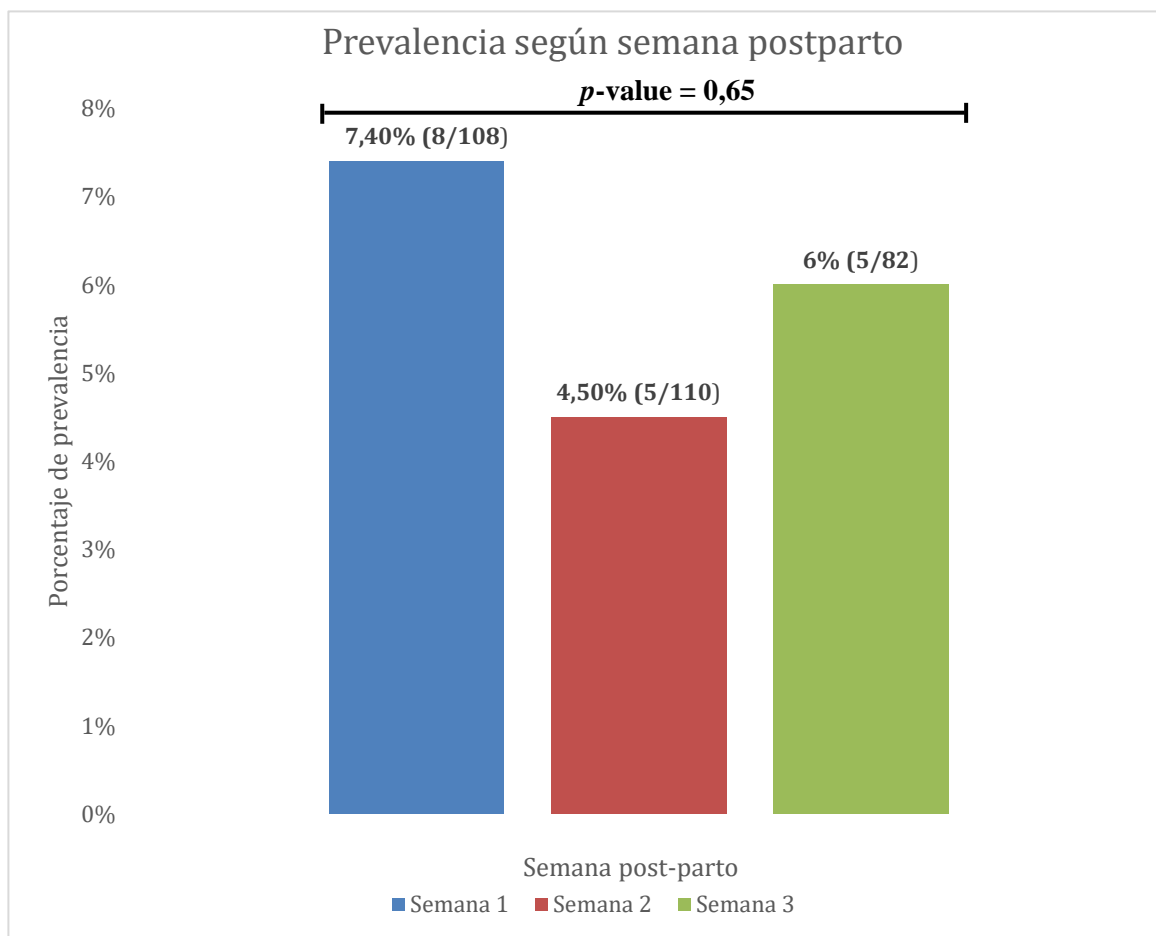


Figura 7. Gráfico de prevalencia según semana posparto

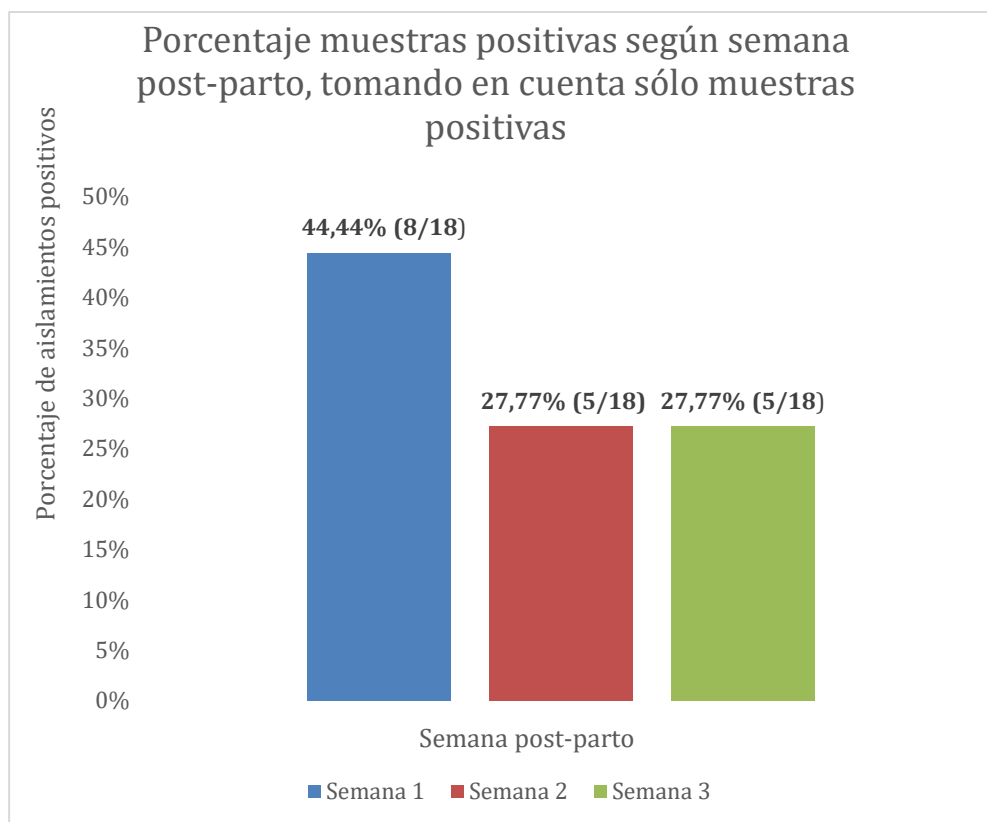


Figura 8. Gráfico de porcentaje muestras positivas a *Salmonella* spp. de acuerdo con la semana postparto.

3.2 Características de las producciones

En todas las visitas se realizó una inspección del manejo en la finca, donde evaluamos cinco aspectos que poseen influencia en la presencia de la bacteria, infraestructura e instalaciones, higiene, manejo de alimentos, control de plagas y manejo de residuos orgánicos. Las inspecciones se realizaron con el objetivo de educar a los productores sobre la importancia de ligar el manejo con la presencia de enfermedades como la salmonelosis, así como informar sobre oportunidades de mejora encontradas en las producciones para poder

realizar las correcciones necesarias y con ello disminuir o prevenir la presencia de la bacteria en las fincas.

Cinco características en cada uno de los aspectos fueron analizadas, mediante una ligera entrevista, así como visualización durante la visita a las granjas. Considerando la importancia de ellas y según los hallazgos observados, se analizó si se consideraban estas características como una enfermedad, de acuerdo con la cantidad de inconformidades (tres o más), se llegaba a considerar el aspecto de la finca como adecuado o inadecuado, si alguna de las inconformidades se consideraba una falta grave, automáticamente el aspecto se tomaba como inadecuado.

Al analizar la infraestructura, las fincas 1 y 5 presentaron características similares que las categorizaban como inadecuadas, principalmente la alta cercanía con otras especies productivas y presentar gran cantidad de grietas y orificios en los suelos de los galerones donde descansan los animales.

La finca 9, si bien sólo presentó dos inconformidades, estas eran importantes a considerar, debido a la presencia de un taller en el mismo galerón de alimentación y la estructura de los comedores estando al nivel del suelo, sin división y con los galpones en malas condiciones, por lo que los animales rotaban entre ellos para alimentarse constantemente. El resto de las fincas presentaron errores leves, y si bien algunas no presentaron división entre los animales en los comederos, sí existía una división con respecto al suelo, por lo que se consideraron adecuadas.

En cuanto a la higiene, la mayoría de las fincas se consideraron inadecuadas, esto debido a que al momento de las visitas era visible zonas con alta cantidad de mugre, moho,

algas o suciedad en los galrones o zonas de almacenaje de alimentos, además se observaron comederos o bebederos evidentemente sin lavar por mucho tiempo. En cuanto a las fincas 2, 4, 7 y 10, las cuales se consideraron como adecuadas, todo lo anteriormente mencionado no ocurrió.

El manejo de los alimentos se consideró inadecuado en la mitad de las fincas de las fincas por diferentes motivos. En las fincas 1, 5 y 8 se evidenció ya sea alimentos o suplementos alimenticios al aire libre o en condiciones donde pueden llegar a humedecerse, además se encontraron sacos o contenedores de alimento y bolsas de suplementos abiertos. Las fincas 9 y 3 presentaron faltas graves, en la finca 3 describieron cómo dejan el alimento en los comederos listos desde la tarde anterior para el ordeño de la mañana, por lo que el alimento se encuentra desatendido en los comedores toda la noche, permitiendo a los vectores de la zona llegar, alimentarse con este y por ende contaminarlo. En cuanto a la finca 9 las zonas en ensilaje se encontraban húmedas y propensas a las condiciones climáticas de la zona, generando un ambiente óptimo para el crecimiento de la bacteria por lo que se consideró una falta grave.

Las fincas consideradas adecuadas correspondieron a las fincas 3, 4, 6, 7 y 10, las cuales tenían su propio almacén para el alimento, libre de humedad, el alimento y los suplementos, si no eran utilizados, se encontraban tapados y sin exposición al ambiente.

El control de plagas en todas las fincas se consideró inadecuado, ya que ninguna presentó ningún protocolo de control de estas. Por último, en cuanto al manejo de residuos orgánicos, sólo las fincas 1, 5 y 6 se consideraron inadecuadas, esto debido a que se observaba acúmulo de los desechos en las cañerías, principalmente en las fincas 5 y 6, posiblemente por

falta de mantenimiento, estas mismas en varios sectores se observaban sin rejilla por lo que existe un potencial contacto con las aguas residuales, además en la finca 1 se observaba como las aguas drenaban directamente a los potreros y en la finca 5 se observó el tanque recolector de heces desbordándose.

Las tablas utilizadas como método de evaluación de las fincas, basándose en diversas características relacionadas con los aspectos, así como los resultados de la inspección pueden ser observadas en el Anexo A (Cuadros A1, A2, y A3). En el Cuadro 2 se muestran cada uno de los aspectos junto con su resultado final para cada finca correspondiente, así como si obtuvieron aislamientos positivos a *Salmonella* spp.

Cuadro 2. Características de las fincas muestreadas

<i>Finca</i>	<i>Región</i>	<i>Población de hembras lactantes</i>	<i>Infraestructura e Instalaciones</i>	<i>Higiene</i>	<i>Manejo de alimentos</i>	<i>Control de plagas</i>	<i>Manejo de residuos orgánicos</i>	<i>Resultado de pruebas</i>
1	Huetar Norte	120	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Positivo
2	Central	100	Adecuado	Adecuado	Inadecuado	Inadecuado	Adecuado	Positivo
3	Central	172	Adecuado	Inadecuado	Adecuado	Inadecuado	Adecuado	Positivo
4	Huetar Norte	170	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Inadecuado	Adecuado	Negativo
5	Huetar Norte	160	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Positivo
6	Central	176	Adecuado	Inadecuado	Adecuado	Inadecuado	Inadecuado	Negativo
7	Huetar Norte	180	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Inadecuado	Adecuado	Negativo
8	Huetar Norte	100	Adecuado	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Adecuado	Negativo
9	Huetar Norte	155	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado	Adecuado	Positivo
10	Central	100	Adecuado	Adecuado	Adecuado	Inadecuado	Adecuado	Negativo

3.3 Perfiles de resistencia a antibióticos

Se realizaron antibiogramas a los 18 aislamientos obtenidos. De éstos, un 72,22% (13/18) resultaron ser pansusceptibles a todos los antibióticos analizados, mientras que 27,77% (5/18) resultaron ser monorresistentes a la nitrofurantoína (Figura 9). En todos los perfiles de obtuvo un CMI de 64 µg/ml.

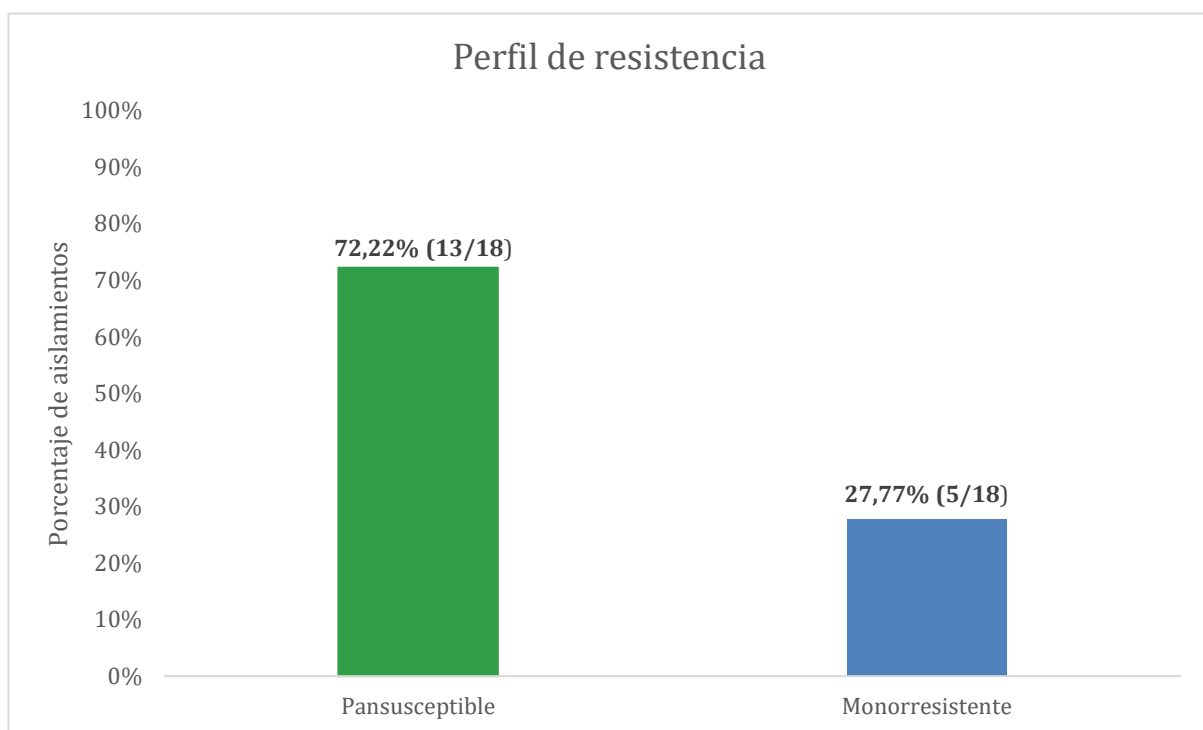


Figura 9. Gráfico de perfiles de resistencia en muestras positivas a *Salmonella* spp.

De las fincas que resultaron positivas, la finca 1 reflejó el 20% (1/5) de aislamientos monorresistentes, la finca 3 el 60% (3/5) y la finca 7 el 20% (1/5). Todos los aislamientos obtenidos de las fincas 2 y 5 resultaron pansusceptibles (Figura 10).

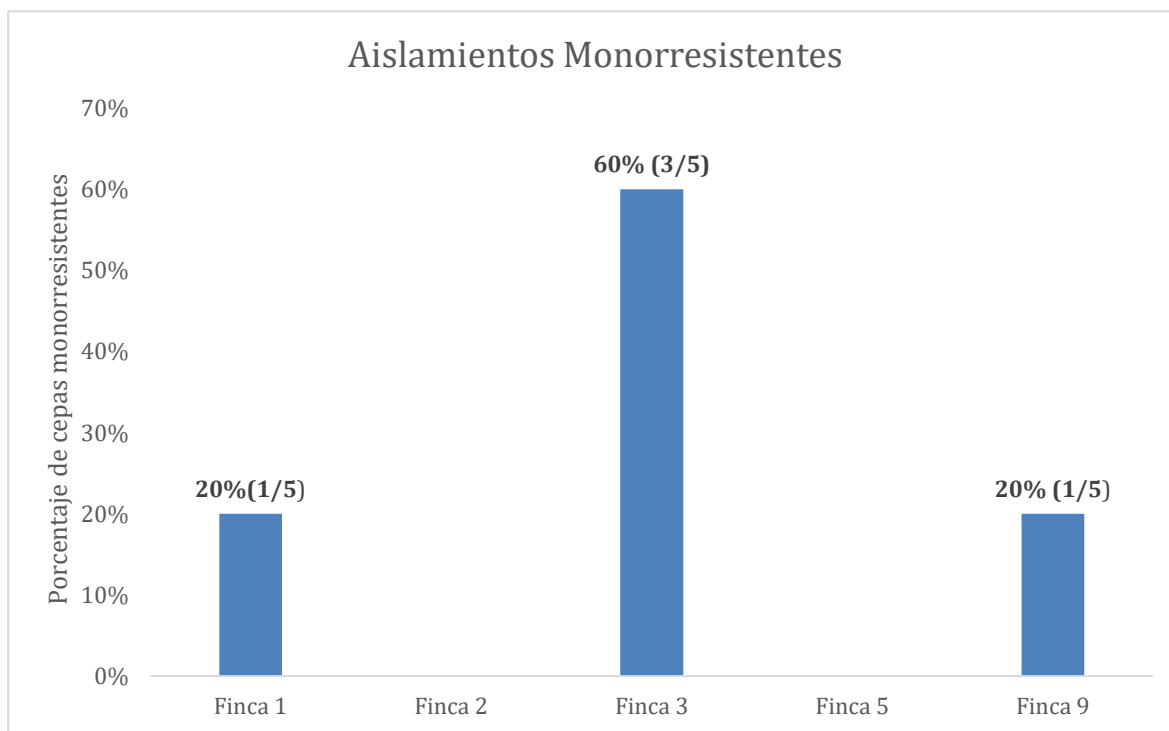


Figura 10. Gráfico de aislamientos monorresistentes de acuerdo con la finca correspondiente.

4. Discusión

4.1 Prevalencia de *Salmonella* spp.

La prevalencia general de *Salmonella* spp. obtenida en el presente estudio y la prevalencia esperada son concordantes, correspondiendo ambas a un 6%. En términos generales, es baja a partir de comparaciones con las prevalencias obtenidas de diferentes estudios realizados en otros países. Esto puede deberse a diferencias entre los tamaños de muestra, los tamaños de los hatos, los sistemas de producción y manejo y las diferencias geográficas entre estos estudios y el nuestro (Blau et al. 2005, Habing et al. 2012, Muñoz-Vargas et al. 2018). Hatos de 100-150 animales son considerados como producciones de mediana a larga escala a nivel nacional pero pequeños en comparación a hatos localizados en otras latitudes, los cuales han sido descritos con bajos porcentajes de *Salmonella* circulante. Hatos con mayor población poseen un mayor riesgo de transmisión y proliferación de *Salmonella* debido a un aumento en la interacción entre pares y por lo tanto del contacto con las heces de animales acarreadores de la bacteria (Holsbach 2017).

Un estudio en Estados Unidos reportó que a mayor número de animales en las granjas mayor era la posibilidad de tener por lo menos un animal positivo a *Salmonella* spp. En ese estudio las granjas consideradas como grandes (granjas con hatos mayores a los 500 animales) correspondieron a un 52% de las granjas positivas mientras que las medias (poblaciones entre los 100 – 500 animales) representaron un 28,20% (Blau et al. 2005). Así también otro estudio observó un 61% de prevalencia de *Salmonella* spp. en fincas con poblaciones mayores a los 500 animales, a diferencia de las fincas entre 100 – 500 animales donde se encontró un 46,30% de prevalencia (Habing et al. 2012).

Estados Unidos, el país que más estudios de prevalencia ha realizado, reporta prevalencias más altas, ejemplo de esto está el estudio realizado por Muñoz-Vargas y colaboradores (2018) en el que obtuvo un 45.63% de muestras positivas a *Salmonella* spp. en hatos lecheros. Ese grupo de investigadores determinaron el progreso de la presencia de la bacteria a lo largo de la etapa de transición por medio de un estudio longitudinal de hatos de entre 175 y 1250 de vacas lecheras, en donde se evidenció la mayor prevalencia de *Salmonella* spp., durante la primera semana postparto y la última semana preparto. Similar en el presente estudio, la primera semana postparto evidenció una mayor proporción de muestras positivas en relación con las semanas de los días ocho y 14 postparto (Muñoz-Vargas et al. 2018).

En India, Murugkar y colaboradores encontraron un 9,60% de prevalencia en aislamientos recolectados de heces de bovinos, siendo *S. Enteritidis*, *S. Thyphimurium* y *S. Bareilly* los serotipos más comunes, y reportaron un riesgo de contaminación cruzada entre cerdos, vacas, gallinas y humanos, debido a su alta proximidad, lo que resalta la transmisión de *Salmonella* por medio de fomites o contaminación ambiental (Murugkar et al. 2005).

Ejemplos de prevalencia bajas también se han reportado en otros estudios a nivel mundial. En Etiopía se evidenció una prevalencia de un 2,30% en bovinos al estudiar 132 hatos con un rango de población desde cinco animales hasta 398. Al igual que en otros estudios ellos reportan una relación significativa entre la presencia de la bacteria y el tamaño del hato, existiendo una mayor probabilidad de presentar la bacteria en los hatos de mayor tamaño ($p = 0,047$) (Egualé et al. 2016).

La estacionalidad es otro factor que pudo influir en los resultados obtenidos en el presente estudio. El tiempo de muestreo se realizó desde finales de mayo hasta el mes de diciembre, por lo que únicamente se muestreó durante la época lluviosa del país. Varios estudios han observado que la prevalencia de la bacteria aumenta durante la época de verano, el equivalente a la época seca en el país, los cuales ven una relación entre la presencia de la bacteria con altas temperaturas (Kanistanon 1997; Pangloli et al. 2008), así como alta humedad. Tomando esto en consideración, se asume que existe una alta probabilidad de que la prevalencia de *Salmonella* spp en ganado lechero sea más alta durante la época seca del país lo cual no fue observado por la disponibilidad de colección de muestras.

Ligado a la estacionalidad del país se encuentra el estrés calórico en el ganado lechero, principalmente en la especie *Bos taurus* cuya adaptación al calor es menor que la especie *Bos indicus* (Heuvelodop et al. 1986; Ebi et al. 2008). Temperaturas de confort de estos animales oscilan entre los 5 y 25 °C, y son particularmente sensibles a las temperaturas cálidas, las cuales se ven acentuadas durante los meses de época seca en el país. Un aumento de la temperatura ambiental estaría asociado a un aumento del estrés calórico (Perera Martínez 2015), esto predispone a que bovinos reservorios de *Salmonella* spp. puedan presentar signos clínicos, aumentando la probabilidad de excreción de la bacteria a través de las heces (Edrington et al. 2004). Estudios que logren comparar las diferencias de la excreción de *Salmonella* spp. en bovinos lecheros entre las épocas seca y lluviosa, así como razas y cruces dentro del país, son altamente recomendados para fortalecer la epidemiología de este agente en hatos bovinos

El manejo y las medidas de bioseguridad aplicadas en las explotaciones lecheras son importantes factores por considerar en el estudio de *Salmonella*. Estas variables fueron

observadas en el presente estudio y se presumen como factores responsables de que algunas fincas tuvieran mayor prevalencia que otras, lo que podría explicar la diferencia estadística significativa entre las prevalencias de la finca 2 y la finca 9 ($p = 0,049$), donde el manejo se daba de manera muy diferente entre cada una, principalmente en cuanto a la higiene y el manejo y almacenaje de los alimentos, los cuales se mencionarán cada uno más adelante.

Un estudio realizado en Estados Unidos observó que los cambios en las prácticas de manejo tienen un impacto en la persistencia de la bacteria en granjas lecheras (Habing et al. 2012). En ese estudio dos granjas se tomaron en cuenta, ambas resultaron positivas a *Salmonella* spp.; sin embargo, únicamente una de las fincas tomó medidas de control y a partir de estos cambios observaron una disminución significativa de las prevalencias de la bacteria tanto en animales (de un 20% a un 7,20%, $p < 0,001$) como en el ambiente (de un 61% a un 33%, $p = 0,01$), y se demostró así el impacto positivo para la reducción de la *Salmonella* en los rebaños y aminorando así el riesgo para los animales y para la salud pública (Cobbold et al. 2006).

4.2 Manejo en las fincas

En el presente estudio, cinco aspectos generales de manejo fueron observados como factores de alta influencia en la aparición de la bacteria, incluyendo infraestructura, higiene de instalaciones, control de plagas, manejo y almacenamiento de alimentos y manejo de residuos orgánicos. A partir de esta evaluación, dos de las diez fincas presentaron prácticas de manejo que podrían considerarse como adecuadas en cuatro categorías, exceptuando control de plagas, mismas dos fincas que resultaron negativas a *Salmonella* spp.

La infraestructura en la mayoría de las granjas incluidas en este estudio presentó similitud en el diseño de las instalaciones incluyendo distribución de las salas de ordeño, tamaño y ventilación en el galerón de alimentación, comederos y zonas de almacenamiento de alimentos, al igual que el sistema de drenaje de aguas residuales. No obstante, las fincas identificadas como *Salmonella* positivas presentaron características que podrían ser clave para que la bacteria estuviera presente, como grietas u orificios ciegos en paredes y pisos que predisponían a acúmulo de materia orgánica y microorganismos, permitiendo formación de biofilms y disminuyendo la efectividad de sustancias aplicadas para la limpieza y desinfección (Martelli et al. 2017; Lee 1998), adicional a esto, la generación de posibles desgastes o lesiones en la suela de los cascos, desarrollándose cojeras en los animales (FAO y IDF 2011). Esto es de considerar ya que es una de las mayores problemáticas en cuanto a bienestar animal y pérdidas económicas asociadas a la disminución de la producción láctea en animales con pododermatitis (O’Driscoll et al. 2009).

Otra disconformidad en cuanto a instalaciones fue la alta cercanía con corrales de otras especies productivas, la cual es considerada un riesgo para la contaminación y transmisión de *Salmonella* spp. (Andres y Davis 2015). Tres de las granjas presentaban esta característica las cuales resultaron positivas. La cercanía entre especies productivas, como cerdos o aves, y medidas de bioseguridad no rigurosamente aplicadas, son factores predisponentes para la contaminación cruzada de agentes infecciosos entre recintos, principalmente por el movimiento de los trabajadores, contaminación por fómites, vectores o vía aerógena (Lorin 2001).

Esta diseminación de *Salmonella* entre producciones es factible ya que tanto bovinos, cerdos y aves han sido descritos como reservorios. Se ha comprobado que los cerdos tienen

la posibilidad de convertirse en portadores de *Salmonella* spp., logrando excretar la bacteria durante 28 semanas sin presentar síntomas, y siendo fuente de contaminación inicial al ambiente y a otros animales, como los bovinos (Andres y Davies 2015). En la Unión Europea, la prevalencia de la bacteria en cerdos ronda entre el 0% y 56% entre las explotaciones comerciales, teniendo una prevalencia media del 33,30% entre sus miembros (Andres y Davies 2015). En cuanto a Estados Unidos varios estudios en múltiples granjas han observado prevalencias entre el 3,40% y 33% (Foley et al. 2008).

De igual forma, las granjas avícolas poseen el mismo potencial para convertirse en vehículos de contaminación. Los pollos son altamente susceptibles a la colonización por la bacteria sin llegar a presentar sintomatología, desde su nacimiento hasta las 96 horas de vida, y su forma de transmisión puede ser tanto vertical como horizontal (Foley et al. 2008). En granjas avícolas las prevalencias en Estados Unidos han llegado a variar entre el 5% hasta el 100% (Foley et al. 2008). En cuanto a la Unión Europea, gracias a los Programas Nacionales de Control (NCP) implementados en el 2007, la prevalencia de la bacteria ha venido en declive; a pesar de ello, en el año 2017 se detectó un 1,87% de prevalencia a *Salmonella* spp. en granjas de pollos de cría, un 3,70% en granjas de gallinas ponedoras y un 1,89% en granjas de pollo de engorde (EFSA y ECDC 2018).

En la presente investigación pudimos observar además deficiencias en los comederos, desnivel del suelo o falta de una separación entre cada galpón para el ganado, los cuales han sido reportados como factores predisponentes para infecciones de *Salmonella*. En Nueva Zelanda un estudio de caso-control realizado por Stevenson y colaboradores (2016) para determinar el origen de un brote de *Salmonella* spp. durante los años 2011-2012, observó que aquellas granjas donde se administraba el alimento en canales de manera continua tenían una

mayor probabilidad de adquirir la enfermedad en comparación con aquellas que administraban el alimento en canales con separadores individuales, determinándolo como uno de los factores de riesgo. Los investigadores llegaron a esta conclusión tomando en cuenta que aquellas vacas que fueran dominantes tomarían mayores cantidades de alimentos que aquellas que fueran más pasivas, lo cual alteraría la microflora de los individuos, volviéndolos más susceptibles a la enfermedad. Además, comederos continuos aumentaban el riesgo de contagio por contacto con la saliva entre las vacas y por ende con microorganismos como *Salmonella* (Stevenson et al. 2016).

En cuando a la higiene de instalaciones, el lavado de los corrales en ocho de las diez fincas se limitaba al lavado del suelo; por lo tanto, se podía observar acúmulo de materia orgánica en las esquinas de los corrales, paredes sucias y en pocos casos ni los bebederos o comederos eran limpiados. Al haber zonas con un alto riesgo de contaminación donde la limpieza es deficiente, inconstante o inclusive inexistente, los microorganismos logran adherirse a las superficies y generar biofilms, los cuales les permiten resistir a mecanismos convencionales de limpieza y desinfectantes, convirtiéndose en fuentes de contaminación para los animales (Trachoo 2003).

En la mayoría de las fincas se observó la sala de ordeño con medidas de higiene y un proceso adecuados, a pesar de esto, dos producciones *Salmonella* positivas (fincas 5 y 9) presentaban medidas de higiene inadecuadas, bebederos sucios, amplias zonas con acúmulo de materia orgánica, pisos agrietados y agua estancada, lo cual sugiere que existen factores predisponentes para la supervivencia del microorganismo en estos recintos. Al comparar la finca 2 y la finca 9, es interesante señalar que la finca 2 presentó condiciones óptimas en

todos los aspectos en la sala de ordeño, a diferencia de la finca 9, donde, como se mencionó, se determinó lo contrario.

La limpieza y desinfección adecuada de los recintos pueden disminuir de manera drástica el riesgo de infección en los animales, en primer lugar, si bien en las fincas no se observó que utilizaran mangueras a presión para la limpieza durante las visitas, se recomienda que las fincas no utilicen estas para la limpieza de los corrales, ya que, aunque puedan eliminar a la suciedad en suelos o paredes, también generan bioaerosoles con la capacidad de infectar tanto a los animales como a los operadores, además éstas no eliminan los biofilms, por lo que no cumplen con el propósito deseado (Holschbach y Peek 2018). El Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad de Wisconsin (WVDL) describe una guía de desinfección y limpieza adecuada para control de *Salmonella* spp., en donde se especifica primero eliminar toda la materia orgánica, posteriormente utilizar detergentes alcalinos y luego detergentes acidificantes, con enjuagues entre estos tres pasos (WVDL 2016).

El control de plagas es uno de los mayores problemas en todas las fincas, ya que ninguna presentó un protocolo de control. En todas las fincas se observaron aves entrando a las zonas de comederos y en algunas se logró observar ratones en las bodegas de alimento. Debido a la presencia de alimento, agua disponible y refugio, animales salvajes son atraídos hacia las granjas y se mantienen en ellas, esto representa un gran problema ya que se sabe que estos animales son fuente de contaminación por *Salmonella* spp., ya sea porque introducen la enfermedad o son acarreadores de la enfermedad ya establecida en la granja.

Es de suma importancia que una vez que las instalaciones sean desinfectadas adecuadamente, se minimice el ingreso de aves, plagas o animales silvestres, ya que pueden infectarse de microorganismos en áreas que son inaccesibles y dispersar la enfermedad en zonas de alto contacto con el alimento de los animales. Se ha demostrado que el control de las poblaciones de roedores disminuye de manera efectiva la presencia de *Salmonella* Enteritidis, esto en fincas de pollos; sin embargo, el mismo principio se puede extrapolar a las granjas ganaderas (Meerburg y Kijlstra 2007).

En cuanto a aves han habido casos donde se observa como estas pueden distribuir la enfermedad a ganado bovino, ejemplo de esto se observó en un caso de estudio en Japón, donde, en una finca lechera, se aislaron cepas de *Salmonella* Typhimurium a partir de muestras fecales de vacas en lactancia, terneros y muestras del ambiente, estos aislamientos resultaron compatibles con la misma cepa que afectó varios grupos de gorriones en la zona, concluyendo en una contaminación por contacto entre las aves y el alimento de los animales de la granja (Tamamura et al. 2015).

La guía de la FSA (Food Standard Agency) del 2016 para productores lecheros en Inglaterra establece como medidas de control para pestes, la remoción de vegetación y basura de las instalaciones, mantener alimentos en contenedores cerrados y eliminar todo el alimento de los comederos luego de cada ordeño, mantener un registro de utensilios para control de plagas como trampas o cebos y determinar sitios clave para colocarlos, de ser necesario se ha de utilizar medidas físicas de control como ventanas o redes de moscas (FSA 2016).

Un detalle importante en varias de las fincas es que los productores mantienen una alta cantidad de gatos en ellas para el control de las plagas. Sin embargo, un estudio en granjas

orgánicas holandesas encontró una relación entre el número de gatos presente en fincas con la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en los animales de las granjas (Meerburg et al. 2006). Si bien los bovinos presentan una resistencia parcial a la enfermedad generada por este parásito, se ha visto la transmisión de taquizoitos en leche no pasteurizada (Tenter et al. 2000). Además, por medio de estudios experimentales se han descrito en terneros síntomas como fiebre, dificultad respiratoria, rinorrea y congestión conjuntival (Costa et al. 1977; Stelzer et al. 2019). Además, los funcionarios de las fincas se encuentran en riesgo de contraer la infección, por lo que, desde un punto de vista de bioseguridad en finca, esto representa un grave problema. En estas producciones se recomendó la vacunación de todos los gatos en la granja, y la reducción de la población para disminuir la probabilidad de infección (Meerburg et al. 2006).

El manejo y almacenamiento de los alimentos es un factor de alta importancia, ya que se ha comprobado como los ensilajes, pasto de corta, alimentos en forma de pellet e inclusive el mismo pasto de los potreros funcionan como reservorios para *Salmonella* spp. (Rodríguez et al. 2006). Además, el alimento es un factor predisponente para la presencia de plagas en las granjas. La mayoría de las fincas, en especial las fincas positivas, mantenían los alimentos en condiciones inadecuadas, por ejemplo: zonas con alta humedad, falta de protección a las condiciones climáticas, fácil acceso para animales salvajes o productos abiertos sin protección., así como también algunas fincas que producían su propio concentrado mantenían la maquinaria sucia y en ambientes abiertos donde animales podían acceder fácilmente. El manejo de este aspecto tanto en la finca 2, como la finca 9 se consideró inadecuado, sin embargo, es importante mencionar que la finca 9 mantenía el alimento en las zonas de ensilaje expuesto al medio ambiente, por lo que, al observar los subproductos, se encontraban

sucios y húmedos, aumentando drásticamente la probabilidad de contaminación, en comparación con la finca 2.

Se han reportado casos donde los animales son infectados por *Salmonella* spp. proveniente de alimentos contaminados (Jones et al. 1982; Anderson et al. 1997) e inclusive se reportó un caso en el Reino Unido donde se dio un brote de *Salmonella* Heidelberg en humanos a partir de leche contaminada, el origen de la enfermedad vino de una vaca con mastitis asintomática la cual consumió alimento contaminado por esta cepa (Knox et al. 1963). Tomando en cuenta que en todas estas fincas los funcionarios o productores consumen leche sin pasteurizar, se demuestra la importancia de mantener el alimento en buenas condiciones no sólo para los animales sino también para la salud pública

Por último, tenemos el manejo de desechos orgánicos, en cuanto al drenaje de las fincas, cuatro de las fincas que dieron negativas presentaron un sistema de desagüe adecuado, sin estancamiento de los desechos, esto a diferencia de la dos de las fincas positivas, donde el drenaje era deficiente e inclusive en algunas se estancaba y desbordaba, manteniendo heces en los corrales y por lo tanto convirtiéndose en fuente de contaminación.

Varias de las fincas reutilizan el estiércol recuperado de los animales, almacenándolo en tanques y siendo utilizado como abono para los pastos, en su mayoría el riego lo realizan en forma líquida y de manera superficial utilizando maquinaria; no obstante, esto es considerado como un factor de riesgo para las fincas. Un estudio realizado por Fossler y colaboradores (2005) indica que animales en fincas que irrigan abonos de manera superficial poseen 2.1 veces más probabilidades de excretar *Salmonella* spp. en heces, además animales que hayan consumido pastos en campos donde se irrigó estiércol, pero no se aró en la misma

temporada, poseen 1.8 veces más probabilidades de eliminar la bacteria en heces (Fossler et al. 2005).

Para evitar que los abonos se conviertan en fuentes de infección se recomienda el almacenamiento de el estiércol de uno a tres meses, esto ya que al almacenarse este puede llegar a generar temperaturas de hasta 55 °C, sin embargo, no de manera uniforme, en las zonas periféricas la temperatura será menor, por lo que otra recomendación sería mantener un movimiento de los desechos dentro de los almacenes, para que la eliminación de los microorganismo se dé en toda la materia orgánica. Por último, se recomienda que los animales no entren a pastar a los potreros irrigados por lo menos por un mes o hasta que no haya señales de desechos orgánicos en los potreros (Hutchison et al. 2000).

La educación de los productores, así como de los funcionarios encargados de las granjas con respecto a medidas de manejo adecuadas, y su influencia en la presencia no sólo de *Salmonella* spp. sino también de otros microorganismos, es de suma importancia para poder minimizar la presencia de la bacteria en aquellas granjas que se encontraron positivas, así como mantener niveles bajos en aquellas que resultaron negativas, y así evitar brotes de esta enfermedad tanto a nivel de los animales como a nivel de la salud humana

4.3 Resistencia a antimicrobianos

Los perfiles de sensibilidad antimicrobiana obtenidos en el estudio demuestran una alta sensibilidad a los antibióticos, tomando en cuenta que sólo cinco de los aislamientos resultaron resistentes a un antibiótico, siendo la nitrofurantoína el único antibiótico al que se tuvo resistencia. La nitrofurantoína es un antibiótico perteneciente a la familia de los nitrofuranos, con un amplio espectro de acción contra bacteria tanto Gram-negativas como

Gram-positivas, su uso fue aprobado por la FDA en Estados Unidos en el año 1953, a partir de entonces se utilizó ampliamente para el tratamiento de enfermedades del tracto urinario inferior gracias a su pobre distribución a tejidos y alta concentración en orina. En el año 1970, con la aparición de antibióticos como trimetoprim/sulfamethoxazole o los betalactámicos, provocó que su popularidad disminuyera (Bains et al. 2009, Huttner et al. 2015)

En la medicina veterinaria la nitrofurantoína se ha utilizado como tratamiento de infecciones y como promotor del crecimiento en explotaciones de animales; aunque, esta última aplicación fue prohibida a partir de 1995 en la Unión Europea (García et al. 2017), y en Costa Rica también se encuentra prohibido el uso de este antibiótico para ese propósito (SENASA 2016).

En años recientes, el aumento de la resistencia a antibióticos como fluoroquinolonas o trimetoprim/sulfamethoxazole ha provocado que se renovara el interés por el uso de la nitrofurantoína, por lo que a partir del año 2000 su uso ha ido en aumento mundialmente. Los mecanismos de acción de este antibiótico no son completamente comprendidos, sin embargo, se conoce que por medio de dos enzimas nitroreductasas se producen metabolitos intermedios los cuales atacan proteínas ribosomales e inhiben por completo la síntesis de proteínas en la bacteria (McOsker y Fitzpatrick 1994; Huttner et al. 2015).

Los mecanismos de resistencia utilizados contra la nitrofurantoína se han relacionado con mutaciones en los genes *nfsA* y *nfsB*, donde, la primera reduce la actividad de las enzimas reductasas, mientras que la segunda amplifica esta reducción, hasta que la actividad llega a ser indetectable (McCalla et al. 1978; Sandergen et al. 2008). Un estudio realizado por García y colaboradores (2017) analiza dos clones de la serovariedad Thyphimurium resistentes a

nitrofurantoína, estos clones son la DT-104 y pUO-StVR2, a partir de los resultados donde todos los clones pUO-StVR2 presentaron resistencia completa mientras que un 26% del clon DT-104 fueron susceptibles, 15% intermedios y 20% resistentes, conjetura como la bacteria podría haber logrado mantener esta resistencia a pesar de que lleva años sin ser utilizado como promotor del crecimiento. Se presume que la estabilidad cromosomal de las mutaciones en estos clones ha permitido que la bacteria logre mantener esta resistencia con el tiempo y eventualmente replicándose y diseminándose en el ambiente, esto mismo puede estar ocurriendo en las muestras resistentes de la presente investigación.

A nivel mundial también se ha observado la resistencia de la nitrofurantoína en diferentes estudios. En Brasil, un estudio sobre brotes por salmonelosis de origen alimentario en personas entre el 2007 y el 2012 reportó un 94% de los aislamientos resistentes a la nitrofurantoína, siendo el antibiótico con mayor resistencia (Capalonga et al. 2014). En Portugal un estudio en aislamientos de *Salmonella* spp. en humanos y en diferentes fuentes de alimentos reportó un 65% de resistencia a la nitrofurantoína, siendo los serotipos Enteritidis y Typhimurium en los que más frecuentemente se encontró resistencia a este antibiótico. Los investigadores asociaron esta resistencia al uso ilegal del antibiótico como promotor del crecimiento (Antunes et al. 2006).

En cuanto a Costa Rica, el INCIENSA, determinó en cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* de aislamientos provenientes de origen humano, un 9% (17/186) de resistencia a la nitrofurantoína, un 21% (35/166) en aislamientos de *S. Paratyphi B* var. Java, provenientes de origen no humano (INCIENSA 2010).

En cuanto al resto de los antibióticos, resulta interesante que todos los aislamientos resultaran sensibles, tomando en cuenta la tendencia a nivel mundial en la que hay un aumento en la resistencia hacia los antibióticos. Sin embargo, otros estudios han tenido resultados similares donde se encuentra una alta sensibilidad, ejemplo de esto es un estudio en Estados Unidos donde encontraron un 87.20% de pansusceptibilidad en aislamientos fecales para *Salmonella* spp., además, de aquellos que se encontró resistencia, la tetraciclina fue el antibiótico con menor susceptibilidad (Lundin et al. 2008).

Un detalle importante por tomar en cuenta es que, si bien se encontró alta susceptibilidad, no todos los antibióticos analizados son utilizados comúnmente en la medicina veterinaria, por lo que otros fármacos que se utilizaran con mayor frecuencia podrían tener resistencia, como por ejemplo la familia de las tetraciclinas, a quienes se les han observado genes de resistencia de manera frecuente en ganado, y se presume que se han vuelto parte estable del genoma de la microflora de estos animales (Kyselková et al. 2015). La selección de estos antibióticos en el estudio se debió a que nuestro enfoque se concentró en determinar la susceptibilidad antibiótica en infecciones por *Salmonella* spp. de origen alimentario o por cuestiones de salud ocupacional en humanos, cuyo punto de origen fueran las granjas.

En general es importante mantener medidas de uso de los antibióticos de manera responsable, con el objetivo de prevenir la selección de bacterias resistentes, las cuales a futuro podrían causar enfermedades sin tratamiento, convirtiéndose en un peligro para la salud pública.

5. Conclusiones

5.1 El presente estudio detectó una prevalencia esperada de *Salmonella* spp. en heces de bovinos de leche durante la etapa de transición, similar a lo reportado en otras latitudes durante meses de invierno.

5.2 Diferencias porcentuales de prevalencia entre las producciones incluidas en el estudio sugiere que factores predisponentes como medidas de bioseguridad laxas y deficiencias en el manejo e instalaciones facilitan la diseminación y sobrevivencia de *Salmonella* en los hatos lecheros.

5.3 Una alta susceptibilidad antibióticos de uso humano fue observada en los aislamientos de *Salmonella* spp recuperados de hatos lecheros, siendo la nitrofurantoína el único antibiótico al cual se le encontró resistencia. Este hallazgo sugiere la permanencia de genes de resistencia estables a través del tiempo de épocas donde se utilizaba la nitrofurantoina como promotor de crecimiento en bovinos en el país.

6. Recomendaciones

6.1 Debido a la escasez de estudios a nivel nacional destinados a la detección de microorganismo, como lo es *Salmonella* spp., así como su resistencia a los antibióticos, en los sistemas de producción animal, es necesario continuar realizando estudios a mayor escala para poder reconocer cuáles de estos llegan a presentarse con mayor frecuencia y en qué condiciones su presencia puede verse favorecida, para que con esta información sea posible establecer las medidas necesarias, determinar las formas adecuadas de implementarlas y así, minimizar el riesgo para la salud pública.

6.2 La educación de los productores y funcionarios de las granjas sobre las buenas prácticas de manejo en ellas, son clave no sólo para poder asegurar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena de producción, sino también en cuanto a la salud ocupacional de los trabajadores. Mediante la educación, podemos implementar protocolos de manejo, bienestar animal y bioseguridad en las granjas y por lo tanto evitar la propagación de enfermedades que pueden provocar problemas de salud pública en las explotaciones pecuarias.

6.3 Es importante asegurar que los productores y funcionarios logren implementar las buenas prácticas de manejo en las granjas, por lo que es importante hacer un llamado a la vigilancia de estas por parte de las instituciones nacionales correspondientes, mediante la implementación de políticas que ayuden y exijan en el control de la enfermedad para que, basándose en los estudios y la legislación, podamos asegurar que los protocolos instaurados se den de manera correcta, y de igual forma, realizar las correcciones necesarias a los errores encontrados, para así mantener un nivel adecuado de manejo en las granjas e inclusive, con el paso de los años, elevar este nivel para así asegurar no sólo el bienestar animal, sino

también el bienestar de los funcionarios y la salud pública nacional a nivel de inocuidad alimentaria.

7. Fuente de Financiamiento

Este proyecto fue financiado a través de materiales y reactivos para el procesamiento de las muestras, cultivos bacterianos y caracterización de los aislamientos donados a la Dra, Lohendy Muñoz Vargas por el Departamento de Medicina Preventiva Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de The Ohio State University, Estados Unidos. El Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional facilitó el equipo e instalaciones para su desarrollo.

8. Bibliografía

1. Anderson, R.J., Walker, R.L., Hird, D.W., Blanchard, P.C. 1997. Case-control Study of an Outbreak of Clinical Disease Attributable to Salmonella Menhaden Infection in Eight Dairy Herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 210(4):528-530.
2. Andres V.M., Davies, R.H. 2015. Biosecurity Measures to Control Salmonella and Other Infectious Agents in Pig Farms: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14 (4): 317-335. doi: 10.1111/1541-4337.12137
3. Antunes, P., Machado, J., Peixe, L. 2006. Illegal use of nitrofurans in food animals: contribution to human salmonellosis? *Clinical Microbiology and Infection*. 12(11): 1047-1049. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01539.x
4. Bains, A., Buna, D., Hoag, N. 2009. A retrospective review assessing the efficacy and safety of nitrofurantoin in renal impairment. *Canadian Pharmacists Journal*. 142(5): 248-252. doi: 10.3821/1913-701X-142.5.248
5. Baldi, M., Barquero-Calvo, E., Hutter, S.E., Walzer, C. 2019. Salmonellosis detection and evidence of antibiotic resistance in an urban raccoon population in a highly populated area, Costa Rica. *Zoonoses and Public Health*. 66 (7): 852-860. doi: 10.1111/zph.12635
6. Barrow PA, Wallis TS. 2005. Salmonella Epidemiology and Pathogenesis in Food-Producing Animals. *EcoSal Plus*. 1(2). doi:10.1128/ecosalplus.8.6.2.1. [Internet]. [citado 2019 En 14]. Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.8.6.2.1>.

7. Beñaldo Fuentes FA. 2012. Enfermedades del período de transición posparto y sus efectos en la producción de leche y fertilidad en un sistema productivo de leche. Santiago, Chile: Tesis (Licenciatura). Universidad de Chile.
8. de Blas, I. 2016. Win Epi Working in Epidemiology. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. España [Internet]. [citado 2019 En 20]. Disponible en: <http://www.winepi.net/>
9. Blau, D.M., McCluskey, B.J., Ladely, S.R., Dargatz, D.A., Fedorka-Cray, P.J., Ferris, K.E., Headrick, M.L. 2005. Salmonella in Dairy Operations in the United States: Prevalence and Antimicrobial Drug Susceptibility. *Journal of Food Protection*. 68(4): 696-702. doi: 10.4315/0362-028x-68.4.696.
10. Bolaños HM, Acuña MT, Duarte F, Tijerino A, Sánchez LM, Vargas JL, Campos E y Red Nacional de Laboratorios. 2012. Alerta: Incremento en las gastroenteritis por Salmonella Weltevreden - vehículo de infección aún no determinado: Tres Ríos, Costa Rica: Centro Nacional de Referencia de Bacteriología, INCIENSA. Costa Rica.
11. Bolaños HM, Acuña HT, Tijerino A, Jiménez A, Duarte F, Sánchez LM, Dittel I, Vargas JL, Campos E, Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología. 2014. Informe de vigilancia basada en laboratorio “Vigilancia basada en laboratorio de Salmonella, Costa Rica, 2013”. INCIENSA.:1–16.
12. Calderón LGR, Delgado PAM, Urbano MFC. 2012. Resistencia de la Salmonela a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. *Rev CES Med Vet Zootec*. 7:115–127.
13. Callaway TR, Keen JE, Edrington TS, Baumgard LH, Spicer L, Fonda ES, Griswold KE, Overton TR, VanAmburgh ME, Anderson RC, et al. 2005. Fecal Prevalence and Diversity

of Salmonella Species in Lactating Dairy Cattle in Four States. *Journal of Dairy Science*. 88(10):3603–3608. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73045-9.

14. Canon, R.M., Roe, R.T. 1982. *Livestock disease survey: a field manual for veterinarians*. Australian Government Publishing Service. Australia, Canberra.

15. Capalonga, R., Campanher-Ramos, R., Correa-Both, J.M., Tiba-Soeiro, M.L., Mendes-Longaray, S. Haas, S., Tondo, E.C. 2014. Salmonella serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 8(7): 811-817. doi: 10.3855/jidc.3791.

16. [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2017. E.E.U.U. [Internet]. [actualizado 2017 Aug 2, citado 2019 En 15]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>

17. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, P.A.: Clinical and Laboratory Standards Institute.

18. Cobbold, R.N., Rice, D.H., Davis, M.A., Besser, T.E., Hancock, D.D. 2006. Long-term persistence of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* serovar Newport in two dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 228(4):585-91. doi: 10.2460/javma.228.4.585.

19. Costa, A.J., Araujo, F.G., Costa, J.O., Lima, J.D., Nascimento, E. 1977. Experimental Infection of Bovines with Oocysts of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*. 63 (2): 212-218. doi: 10.2307/3280042

20. Cummings KJ, Warnick LD, Elton M, Rodriguez-Rivera LD, Siler JD, Wright EM, Gröhn YT, Wiedmann M. 2010. Salmonella enterica Serotype Cerro Among Dairy Cattle in New York: An Emerging Pathogen? *Foodborne Pathog Dis.* 7(6):659–665. doi:10.1089/fpd.2009.0462.
21. Davidson KE, Byrne BA, Pires AFA, Magdesian KG, Pereira RV. [Internet] 2018. Antimicrobial resistance trends in fecal Salmonella isolates from northern California dairy cattle admitted to a veterinary teaching hospital, 2002-2016. *PLoS One.* 13(6). doi:10.1371/journal.pone.0199928. [citado 2019 En 8]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6023112/>.
22. Drackley JK. 1999. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *Journal of Dairy Science.* 82(11):2259–2273. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3.
23. Ebi, K.L., Burton, I., McGregor, G. [Internet] 2008. *Biometeorology for Adaptation to Climate Variability and Change.* Springer Science & Business Media. [citado 2020 Oct. 11] https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8921-3_1
24. Edrington, T.S., Schultz, C.L., Genovese, J.K., Callaway, T.R., Loofer, M.L., Bischoff, K.M., McReynolds, J.L., Anderson, R.C., Nisbet, D.J. 2004. Examination of Heat Stress and Stage of Lactation (Early versus Late) on Fecal Shedding of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in Dairy Cattle. *Foodborne Pathogens and Disease.* 1(2): 114-119. doi: 10.1089/153531404323143639.
25. Eguale, T., Engidawork, E., Gebreyes, W., Asrat, D., Alemayehu, H., Johnson, R., Gunn, J. 2016. Fecal prevalence, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Salmonellae*

in dairy cattle in central Ethiopia. *BMC Microbiology*. 16 (1). doi: 10.1186/s12866-016-0638-2

26. [EFSA] European Food Safety Authority, [ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*. 14(12):231. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634.

27. [EFSA] European Food Safety Authority, [ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control. 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. 16(12): :5500 doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500

28. Eng S-K, Pusparajah P, Mutalib N-SA, Ser H-L, Chan K-G, Lee L-H. 2015. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*. 8(3):284–293. doi:10.1080/21553769.2015.1051243.

29. Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 144(3–4):60–71. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.11.007.

30. [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations and [IDF] International Dairy Federation. 2011. Guide to good farming practice. *Animal Production and Health Guidelines*. No. 8. Rome.

31. Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R. 2008. Salmonella challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*. 86(14): 149-162. doi: 10.2527/jas.2007-0464.
32. [FSA] Food Standard Agency. 2016. Milk hygiene on the dairy farm: a practical guide for milk producers. Inglaterra. [Internet]. [Citado: 2019 May 20] Disponible en: https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/milk-hygiene-guide-for-milk-producers_0.pdf
33. Forbes BA. 2009. *Diagnostico Microbiológico*. 12th ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
34. Forsythe SJ. 2011. *The Microbiology of Safe Food*. John Wiley & Sons.
35. Fossler CP, Wells SJ, Kaneene JB, Ruegg PL, Warnick LD, Bender JB, Eberly LE, Godden SM, Halbert LW. 2005. Herd-level factors associated with isolation of Salmonella in a multi-state study of conventional and organic dairy farms I. Salmonella shedding in cows. 70(3):257–277. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.04.003.
36. García, V., Montero, I., Bances, M., Rodicio, R., Rodicio, M.R. 2017. Incidence and Genetic Bases of Nitrofurantoin Resistance in Clinical Isolates of Two Successful Multidrug-Resistant Clones of Salmonella enterica Serovar Typhimurium: Pandemic “DT 104” and pUO-StVR2. *Microbial Drug Resistance*. 23(4): 405-412. doi: 10.1089/mdr.2016.0227.
37. Grimmont P., Weill F.X. 2007. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. 9th ed. [WHO] World Health Organization collaborating center for reference and research on Salmonella. Paris, Francia.

38. Gross J., van Dorland H.A., Bruckmaier R.M., Schwarz F.J. 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *Journal of Dairy Science* 94 (4): 1820-1830.
39. Gupta A, Fontana J, Crowe C, Bolstorff B, Stout A, Duyne SV, Hoekstra MP, Whichard JM, Barrett TJ, Angulo FJ, et al. 2003. Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Newport Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*. 188(11):1707–1716. doi:10.1086/379668.
40. Gutiérrez Castillo A del C, Calderón Apodaca NL, Paasch Martínez. 2008. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria México*. 39(1):81–90.
41. Habing, G.G., Lombard, J.E., Koprak, C.A., Dargatz, D.A., Kaneene, J.B. 2012. Farm-Level Associations with the Shedding of *Salmonella* and Antimicrobial-Resistant *Salmonella* in U.S. Dairy Cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*. 9(9): 815-21. doi: 10.1089/fpd.2012.1149.
42. Hardy A. 2015. *Salmonella Infections, Networks of Knowledge, and Public Health in Britain, 1880-1975*. Oxford University Press. p. 6-7.
43. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, Praet N, Bellinger DC, de Silva NR, Gargouri N, et al. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med*. 12(12). doi:10.1371/journal.pmed.1001923. [Internet]. [citado 2019 En 30]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4668832/>.

44. Hensel, M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*. 294: 95-102. doi: doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.025
45. Heuveldop, J., Pardo-Tasie, J., Quirós-Conejo, S., Espinosa-Prieto, L. 1986. *Agroclimatología Tropical*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica.
46. Holschbach, C.L., Peek, S.F. 2018. *Salmonella in Dairy Cattle*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 34(1):133-154. doi: 10.1016/j.cvfa.2017.10.005
47. Hutchison, M.L., Nicholson, F.A., Smith, K. A., Keevil, C.W., Chambers, B.J., Moore, A. 2000. A Study on Farm Manure Applications to Agricultural Land and as Assessment of the Risks of Pathogen Transfer into the Food Chain. Report to MAFF. Joint Food Safety and Standards Group (now Food Standards Agency) Project FS2526.
48. Huttner, A., Verhaegh, E.M., Harbarth, S., Muller, A.E., Theuretzbacher, U., Mouton, J.W. 2015. Nitrofurantoin Revisited: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 70(9):2456-2564. doi: 10.1093/jac/dkv147.
49. [INEC] Instituto Nacional de Estadística y Censos. 2015. VI Censo nacional agropecuario: actividades pecuarias, prácticas y servicios agropecuarios. San José, Costa Rica.
50. [INCIENSA] Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. 2010. Informe de vigilancia basada en laboratorio: bacterias causantes de infecciones comunitarias de importancia en salud pública y su resistencia a los 95 antimicrobianos. Tres Ríos, Cartago. Centro Nacional de Referencia de Bacteriología. Costa Rica.

51. Jajere, S.M. 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*. 12(4): 504-521. doi: 10.14202/vetworld.2019.504-521
52. Jimenez, R.R., Barquero-Calvo, E., Abarca, J.G, Porras, L.P. 2015. *Salmonella* isolates in the introduced asian house gecko (*Hemidactylus frenatus*) with emphasis in *Salmonella* Weltevreden, in two regions in Costa Rica. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 15 (9): 550-555. doi: 10.1089/vbz.2015.1785
53. Jones, P.W., Collins, P., Brown, G.T., Aitken, M. 1982. Transmission of *Salmonella* mbandaka to cattle from contaminated feed. *Epidemiology and Infection*. 88(2): 255-263. doi: 10.1017/s002217240007011x
54. Kanistanon, K. 1997. Correlation of Environmental Temperature, Precipitation, and Humidity with *Salmonella* Culture Results from Cattle in Virginia. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine. Virginia, USA.
55. Kyselková, M., Jirout, J., Vrchotová, N., Schmitt, H., Elhottová, D. 2015. Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm. *Frontiers in Microbiology*. 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00536
56. Knox, W.A., Galbraith, N.S., Lewis, M.J., Hickie, G.C., Johnston, H.H. 1963. A Milk-Borne Outbreak of Food Poisoning Due to *Salmonella* Heidelberg. *The Journal of hygiene*, 61(2), 175–185. doi: 10.1017/s002217240002088x
57. Leekitcharoenphon P, Hendriksen RS, Le Hello S, Weill F-X, Baggesen DL, Jun S-R, Ussery DW, Lund O, Crook DW, Wilson DJ, et al. 2016. Global Genomic Epidemiology of

Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104. Kivisaar M, editor. Applied and Environmental Microbiology. 82(8):2516–2526. doi:10.1128/AEM.03821-15.

58. Lenington, K. 1967. Salmonella—History and Occurrence in Foods. Food, Drug, Cosmetic Law Journal. 2(1): 20-24. [Internet]. [citado: 02 Jul 20]. www.jstor.org/stable/26656253

59. Lee-Wong, A.C. 1998. Biofilms in Food Processing Environments. Journal of Dairy Science. 81:2765–2770. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75834-5

60. Lundin, J.I., Dargatz, D.A., Wagner, B.A., Lombard, J.E., Hill, A.E., Ladely, S.R., Fedorka-Cray, P.J. 2008. Antimicrobial Drug Resistance of Fecal Escherichia coli and Salmonella spp. Isolates from United States Dairy Cows. Foodborne Pathogens and Disease. 5(1): 7-19. doi: 10.1089=fpd.2007.0018

61. Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G, Finlay, B.B. 2000. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes and infection. 2(2): 145-156. doi: 10.1016 / s1286-4579 (00) 00273-2.

62. Martelli, F., Lambert, M., Butt, P., Cheney, T., Tatone, F.A., Callaby, R., Rabie, A., Gosling, R.J., Fordon, S., Crocker, G., Davies, R.H., Smith, R.P. 2017. Evaluation of an Enhanced Cleaning and Disinfection Protocol in Salmonella Contaminated Pig Holdings in the United Kingdom. PloS one, 12(6): e0178897. doi: 10.1371/journal.pone.0178897

63. Martínez R. 2017. Salud y enfermedad del niño y del adolescente. 8th ed. México: Editorial El Manual Moderno.

64. Mastroeni P, Grant AJ. 2011. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 13. doi:10.1017/S1462399411001840. [Internet]. [citado 2019 En 27]. Disponible en: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1462399411001840.
65. Mastroeni P, Maskell D. 2006. *Salmonella Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects*. Cambridge University Press.
66. McCalla, D.R., Kaiser, C., Green, M.H.L. 1978. Genetics of Nitrofurazone Resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 133(1): 10-16. doi: 10.1128/JB.133.1.10-16.1978
67. McDermott PF, Zhao S, Tate H. 2018. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. In: Schwarz, Cavaco, Shen, editors. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*. American Society of Microbiology. p. 261–287. [Internet]. [citado 2019 En 30]. Disponible en : <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819804.chap12>.
68. McOsker, C.C., Fitzpatrick, P.M. 1994. Nitrofurantoin: Mechanism of Action and Implications for Resistance Development in Common Uropathogens. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 33: 23-30. doi: doi.org/10.1093/jac/33.suppl_a.23
69. Meerburg, B.G., Kijlstra, A. 2007. Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87: 2774-2781. doi: 10.1002/jsfa.3004
70. Meerburg, B.G., Van Riel, J.W., Cornelissen, J.B., Kijlstra, A., Mul, M.F. 2006. Cats and Goat Whey Associated With *Toxoplasma Gondii* Infection in Pigs. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 6(3):266-274. doi: 10.1089/vbz.2006.6.266.

71. Ministerio de Salud. 2016. Boletín estadístico de enfermedades de declaración obligatoria. Dirección vigilancia de la salud. Unidad de seguimiento de indicadores de salud. Costa Rica.
72. Minitab® Statistical Software. 2010. State College, PA: Minitab, Inc. [Internet]. [citado 2019 Abr 3] Disponible en: www.minitab.com
73. Montoya Villafane, H.H. 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2nd ed. Colombia: Universidad de Antioquia.
74. Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 4(2). [Internet]. [citado 2019 En 9]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/>. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
75. Muñoz-Vargas L, Opiyo SO, Digianantonio R, Williams ML, Wijeratne A, Habing G. 2018. Fecal microbiome of periparturient dairy cattle and associations with the onset of Salmonella shedding. Yildirim A, editor. *PLOS ONE.* 13(5):e0196171. doi:10.1371/journal.pone.0196171.
76. Murugkar, H.V., Rahman, H., Kumar, A., Bhattacharyya, D. 2005. Isolation, phage typing & antibiogram of Salmonella from man & animals in northeastern India. *The Indian journal of medical research.* 122(3): 237–242.
77. Nielsen LR. 2013. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of Salmonella Dublin in cattle. *Veterinary Microbiology.* 162(1):1–9. doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.003.

78. O'Driscoll, K.K.M., Schutz, M.M., Lossie, A.C., Eicher, S.D. 2009. The effect of floor surface on dairy cow immune function and locomotion score¹. *Journal of Dairy Science*. 92 (9): 4249-4261. doi: 10.3168/jds.2008-1906
79. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. 2005. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2(2):115–129. doi:10.1089/fpd.2005.2.115.
80. Pangloli, P., Dje, Y., Ahmed, O., Doane, C.A., Oliver, S.P., Draughon, F.A. 2008. Seasonal Incidence and Molecular Characterization of Salmonella From Dairy Cows, Calves, and Farm Environment. *Foodborne Pathogens and Disease*. 5(1): 87-96. doi: 10.1089/fpd.2008.0048.
81. Perera-Martinez, I. 2015. Manejo de hembras durante la gestación, el parto y la lactancia de las crías. Editorial Elearning, S.L. España. p. 59-61.
82. Ramos Jiménez J. 2012. *Infectología clínica*. 2nd ed. México: Editorial El Manual Moderno.
83. Rhen M, Maskell D, Mastroeni P, Threlfall J. 2007. *Salmonella: Molecular Biology and Pathogenesis*. Horizon Scientific Press.
84. Romero Cabello R. 2007. *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. 3rd ed. México: Ed. Médica Panamericana.

85. Romero Cabello R, Herrera Benavente IF. 2002. Síndrome diarreico infeccioso. Editorial Médica Panamericana. [Internet]. [citado 2019 En 27]. Disponible en: <https://books.google.co.cr/books?id=nPPrtLGwe8C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.
86. Rodríguez, A., Pangloli, P., Richards, H.A., Mount, J.R., Draughon, F.A. 2006. Prevalence of Salmonella in Diverse Environmental Farm Samples. *Journal of food protection*. 69(11): 2576–2580. doi: 10.4315/0362-028x-69.11.2576
87. Sandergen, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G., Andersson, D.I. 2008. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62(3): 95–503. doi: 10.1093/jac/dkn222
88. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*. 17(1):7–15. doi:10.3201/eid1701.P11101.
89. [SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2016. Plan nacional de residuos 2016 e informe de programa nacional de residuos 2015. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Lagunilla, Heredia. Costa Rica.
90. Seth-Smith, H.M. 2008. SPI-7: Salmonella's Vi-Encoding Pathogenicity Island. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2(4): 267-271. doi: 10.3855/jidc.220.
91. Sparham SJ, Kwong JC, Valcanis M, Easton M, Trott DJ, Seemann T, Stinear TP, Howden BP. 2017. Emergence of multidrug resistance in locally-acquired human infections with *Salmonella* Typhimurium in Australia owing to a new clade harbouring bla CTX-M-9.

International Journal of Antimicrobial Agents. 50(1):101–105. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.02.014.

92. Stelzer, S., Basso, W., Benavides Silván, J., Ortega-Mora, L.M., Maksimov, P., Gethmann, J. Conraths, F.J., Schares, G. 2019. Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. Food and Waterborne Parasitology 15. [Internet]. [citado 2020 Oct 11]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405676618300441?via%3Dihub#bb0400> doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00037.

93. Stevenson, M.A., Morgan, P.L., Sanhueza, J., Oakley, G.E., Bateman, R.S., McPhadden, A., MacPherson, N., Owen, K.L., Burton, L., Walsh, S., Weston, J., Marchant, R., 2016. A case-control study to identify risk factors for acute salmonellosis in New Zealand dairy herds, 2011–2012. Epidemiology & Infection. 144(10): 2154-2164. doi: 10.1017/S095026881600042X

94. Sundrum A. 2015. Metabolic Disorders in the Transition Period Indicate that the Dairy Cows' Ability to Adapt is Overstressed. Animals (Basel). 5(4):978–1020. doi:10.3390/ani5040395.

95. Talley NJ. 2011. Clinical Gastroenterology: A Practical Problem-Based Approach. Elsevier Health Sciences.

96. Tamamura, Y., Uchida, I., Tanaka, K., Nakano, Y., Izumiya, H., Takahashi, T., Kikuchi, N. 2015. A case study on Salmonella enterica serovar Typhimurium at a dairy farm associated with massive sparrow death. Acta Veterinaria Scandinavica. 58: 23. doi: 10.1186/s13028-016-0205-8.

97. Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*. 30(12-13): 1217–1258. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00124-7.
98. Tindall BJ. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 55(1):521–524. doi:10.1099/ijs.0.63580-0.
99. Trachoo. N., 2003. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 25(6): 807-815.
100. Uribe C, Suarez MC. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica*. 37(2):151–158.
101. Velge P, Cloeckaert A, Barrow P. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*. 36(3):267–288. doi:10.1051/vetres:2005005.
102. Wankhade PR, Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Ramesha KP, Sejian V, Rajendran D, Varghese MR. 2017. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Veterinary World*. 10 (11):1367–1377. doi:10.14202/vetworld.2017.1367-1377.
103. Webb, H.E, Brichta-Harhay, D.M., Brashears, M.M., Nightingale, K.K., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Kalchayanand, N., Schmidt, J.W., Wang, R., Granier, S.A., Brown, T.R., Edrington, T.S., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Loneragan, G.H. 2017. *Salmonella* in Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle at Slaughter. *Frontiers in Microbiology*. 8, 2214. doi: 10.3389/fmicb.2017.02214.

104. Wegener H.C., Hald T., Wong L.F., Madsen M., Korsgaard H., Bager F., Gerder-Smith, P., Molbak K. 2003. Salmonella Control Programs in Denmark. *Emerg Infect Dis.* 9(7): 774-780. doi: 10.3201/eid0907.030024
105. Wells S.J., Fedorka-Cray P.J., Dargatz D.A., Ferris K., Green A. 2001. Fecal Shedding of Salmonella spp. by Dairy Cows on Farm and at Cull Cow Markets. *Journal of Food Protection.* 64(1): 3–11. doi:10.4315/0362-028X-64.1.3.
106. [WHO] World Health Organization. 2004. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment Geneva, December 1 – 5, 2003. :40.
107. [WVDL] Winsconsin Veterinary Diagnostic Laboratory. 2016. Proper cleaning and disinfection post confirmation of salmonellosis [Internet]. [citado 2020 May 15]. Disponible en: <https://www.wvdl.wisc.edu/wp-content/uploads/2016/11/WVDL-Disinfection-and-Cleaning-Protocol-v2-16-11-14-1.pdf>.
108. Wray C., Wray A. 2000. *Salmonella in Domestic Animals*. Inglaterra: CABI.

9. Anexos

Anexo A. Tablas de evaluación de manejo en las fincas.

Cuadro A1. Tabla de análisis de los aspectos: manejo de residuos orgánicos

Leyenda: Conforme = C Grave = G Inconforme = I Puntuaciones de 3 o más = Inadecuado

Tabla de evaluación de manejo de residuos orgánicos										
Aspectos de manejo	Números de finca									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Condiciones de la cañería	I	C	C	C	I	G	C	C	C	C
Acúmulo de materia fecal en cañería	C	C	C	C	I	G	C	C	C	C
Desecho adecuado de los residuos	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C
Procesamiento adecuado de residuos para abono	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C
Manejo de las pasturas abonadas	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C

Cuadro A2. Tabla de análisis de los aspectos: infraestructura e higiene**Leyenda:** Conforme = C Grave = G Inconforme = I Puntuaciones de 3 o más = Inadecuado

Aspectos de manejo		Números de finca												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Infraestructura e instalaciones	Cercanía con otras especies productivas	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C
	Condiciones de infraestructura	I	C	I	C	I	C	C	C	C	G	C	C	C
	Condiciones de suelo	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C
	Estructura de comederos	C	I	C	C	C	C	C	C	C	G	C	C	C
	Estructura bebederos	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Higiene	Frecuencia de limpieza	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	Presencia de zonas sucias	I	I	I	C	I	C	C	C	I	C	I	C	I
	Higiene de comederos durante la visita	I	C	I	C	I	C	C	C	I	C	C	C	C
	Higiene de bebederos durante la visita	I	C	I	C	I	C	C	C	I	C	I	C	C
	Suciedad en animales	C	C	C	C	C	I	C	C	I	C	I	C	C
			3	1	3	0	3	3	0	3	3	3	1	

Cuadro A3. Tabla de análisis de los aspectos: manejo de alimentos y control de plagas

Leyenda: Conforme = C Grave = G Inconforme = I Puntuaciones de 3 o más = Inadecuado

Aspectos de manejo		Números de finca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Manejo y almacenaje de alimentos	Almacenes sin humedad	I	C	C	C	I	C	C	I	C	C	C	C
	Productos cerrados	I	C	C	C	I	I	C	I	C	C	C	C
	Manejo adecuado de silos	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	Separación entre suelo y sacos de alimento	I	C	C	C	I	C	C	I	C	C	C	C
	Manejo del alimento en comederos	C	G	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C
Control de plagas	Presencia de plagas en instalaciones	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C
	Presencia de plagas en almacenes	C	C	C	C	I	C	G	C	C	C	C	C
	Protocolo de control de plagas	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C
	Presencia de otros animales (gatos)	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C
	Contacto de las plagas con el alimento	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C