

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Estimación de la prevalencia, susceptibilidad antimicrobiana
y serotipificación de *Salmonella enterica* recuperada de
primates no humanos de nuevo mundo, de alimentos y de
superficies en centros de cautiverio de animales silvestres en
Costa Rica**

Modalidad: Tesis de grado

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

Ernesto Rojas Sánchez

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2022

Tribunal Examinador

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

Julia Rodríguez Barahona, PhD
Subdirectora, Escuela de Medicina Veterinaria

Lohendy Muñoz Vargas, PhD
Tutora

Mauricio Jiménez Soto, M.Sc
Lector

Elías Barquero Calvo, PhD
Lector

Fecha: _____

Dedicatoria

A mi todo, a la joya más hermosa que esta vida me ha dado, a mi familia: Mi mamá, Ileana María Sánchez Cabalceta; Mi papá, Oscar Guillermo Rojas Murillo; Mi hermano, Jose Miguel Rojas Sánchez y mi abuelita, María del Carmen Cabalceta Barrantes, que definitivamente sin ustedes no sería nada, los amo. Las palabras se quedan cortas para describir lo que representan en mi vida. A mis tíos Gerardo, Ronny (q.e.p.d.) y Armando, así como sus familias por el apoyo durante la carrera.

Agradecimientos

A la Dra. Lohendy Muñoz Vargas por esta increíble oportunidad de aprendizaje y desarrollo. Por toda la paciencia y acompañamiento de este proceso. Una excelente persona dentro y fuera de la universidad que me ayudó a crecer en el mundo de la investigación al involucrarme en sus proyectos y brindarme oportunidades únicas. También a su grupo de estudiantes y ahora doctores en el Laboratorio de Salud Pública y Alimentos con las cuales compartí y aprendimos en este proceso. En especial a Farida, Laura, Gustavo, Adriana, Sabrina y Raquel.

Al Dr. Mauricio Jiménez Soto por las diferentes oportunidades en las cuales me involucró en el HEMS y desafíos que me propuso durante mi etapa como estudiante que me hicieron crecer como persona y como veterinario. Me siento privilegiado de haber participado en los múltiples proyectos del HEMS y por los cuales también se me abrieron muchas oportunidades de aprendizaje invaluable. Asimismo al grupo de doctores asistentes y personal del HEMS que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y enseñarme. En especial a la Dra. Vega, Dr. Pereira, Daniel, Geizel, Sebastián, Mau Guerra, Montero, Dr. Vega, Randall y doña Milena.

Al Dr. Elías Barquero Calvo por aceptar ser el lector del proyecto y sobre todo junto con su grupo de trabajo en el Laboratorio de Bacteriología por abrirnos las puertas de manera tan acogedora para llevar a cabo las pruebas laboratoriales en sus instalaciones. Sus enseñanzas y ayuda fueron esenciales para completar esta labor. Les agradezco el apoyo brindado. En especial a Dionei, Xindy, Dylcia, Nazareth y la Dra. Aida.

A mis compañeros de la universidad, de laboratorio, del hospital, en especial a mis amigos Alejandro, Albert, Diego, Marcela, Edgar, Jose Félix, Juan Diego, Juan Ernesto, Gabriela, Mariana, Daniela, Marcony, Laura, Michelle, Milena, Stephanie, Carolina, Jesús, Valeria, Guillermo, Paola, Brenda y Sofía que me acompañaron durante todo este proceso universitario y han sido muy importantes para mí.

A todos los sitios de manejo y sus respectivos encargados que me colaboraron y recibieron de una manera muy cordial y amable durante los muestreos. Sin ellos esto no habría sido posible.

Agradezco al Departamento de Medicina Preventiva de la Universidad Estatal de Ohio, en especial a la Dra. Dixie Mollenkopf por el apoyo a mi desarrollo y el de esta tesis. A la Dra. Dubraska Díaz-Campos por las recomendaciones brindadas.

Al Dr. Francisco Duarte y su equipo en el INCIENSA por el procesamiento de las muestras.

A la Dra. Ana Jiménez y el personal del Laboratorio de Parasitología por colaborar con exámenes coproparasitológicos para los primates de este estudio.

A la Dra. Patricia Conrad por sembrar en mi la semilla de la investigación en temas de Una Salud, apoyarme y motivarme a continuar en este camino.

Al personal docente y administrativo de la EMV, UNA y FOCAES por el apoyo durante el proceso.

Tuve la bendición de contar con el apoyo de muchas personas durante este proceso, a todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de Cuadros	viii
Índice de Figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de <i>Salmonella</i>	1
1.2 <i>Salmonella</i> en Animales Silvestres en Cautiverio	4
1.3 Patogénesis del estado portador de <i>Salmonella</i> spp.	9
1.4 Resistencia Antimicrobiana y <i>Salmonella</i> en Animales Silvestres en Cautiverio	10
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo General	21
4.2 Objetivos Específicos	21
5. MATERIALES Y METODOLOGÍA	22
5.2 Muestreo	23
5.3 Método de Muestreo	25
5.4 Procesamiento de muestras	26
5.4.1 Aislamiento de <i>Salmonella</i> en heces	26
5.4.2 Aislamiento de <i>Salmonella</i> de gazas de superficies y alimentos	26
5.5 Confirmación Fenotípica	27
5.6 Identificación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas aisladas con el sistema VITEK® 2	28
5.7 Confirmación Genotípica por medio del gen <i>hliA</i>	29
5.8 Identificación de Serotipos de los Aislamientos Recuperados	30
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33

7. RESULTADOS	35
7.1 Prevalencia de <i>Salmonella</i>	35
7.2 Perfil de susceptibilidad a los Antibióticos	39
7.3 Caracterización del Serotipo	41
8. DISCUSIÓN	43
8.1 <i>Salmonella</i> en heces de primates	45
8.2 <i>Salmonella</i> en muestras ambientales.	49
8.3 <i>Salmonella</i> en los alimentos evaluados.	53
8.4 Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de aislamientos obtenidos.	57
8.5 Serotipos identificados	64
9. CONTROL DE LOS AGENTES INFECCIOSOS	70
10. TRATAMIENTO DE LOS PRIMATES	72
11. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	73
12. RELEVANCIA DE LA SALUD PÚBLICA	75
13. CONCLUSIONES	76
14. RECOMENDACIONES	78
16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
17. ANEXOS	119

Índice de Cuadros

Cuadro 1. <i>Tipos de muestras de alimentos y superficies muestreadas de centros de acopio de animales silvestres que alberguen primates en Costa Rica.....</i>	<i>24</i>
Cuadro 2. <i>Cebadores utilizados en el PCR para la identificación del gen h1A de Salmonella.....</i>	<i>30</i>
Cuadro 3. <i>Cebadores utilizados en el PCR para la serotipificación de Salmonella enterica.....</i>	<i>31</i>
Cuadro 4. <i>Características de la población de 180 primates no humanos incluidos en el estudio.....</i>	<i>36</i>
Cuadro 5. <i>Frecuencias de Salmonella enterica recuperadas de muestras de heces de primates en diez sitios de manejo de animales silvestres en cautiverio en Costa Rica...37</i>	<i>37</i>
Cuadro 6. <i>Frecuencia de Salmonella enterica recuperada de superficies ambientales en diez sitios de manejo de animales silvestres en cautiverio en Costa Rica.....</i>	<i>38</i>
Cuadro 7. <i>Frecuencia de Salmonella enterica recuperada de muestras de alimentos para primates recolectadas en diez sitios de manejo de animales silvestres en cautiverio en Costa Rica.....</i>	<i>38</i>
Cuadro 8. <i>Frecuencia de perfiles de susceptibilidad basados en los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 41 aislamientos de Salmonella recuperados de heces, alimentos y ambiente.....</i>	<i>39</i>
Cuadro 9. <i>Frecuencia de perfiles de resistencia obtenidos a partir del total de aislamientos de Salmonella.....</i>	<i>40</i>
Cuadro 10. <i>Frecuencia de perfiles de susceptibilidad y serotipo identificado en 41 aislamientos de Salmonella recuperada de heces, superficies y alimentos en centros de cautiverio de Costa Rica.....</i>	<i>42</i>

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Primates no humanos muestreados según especie en el estudio en 10 sitios de manejo</i>	35
--	----

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AM: Ampicilina

AN: Amicacina

AVAD: Años de vida ajustado por discapacidad.

APB: Agua peptonada buferada

CAZ: Ceftazidima

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades

CF: Cefalotina

CIP: Ciprofloxacina

CMI: Concentración Mínima Inhibidora

CL: Colistina

CTX: Cefotaxima

EMV: Escuela de Medicina Veterinaria, Costa Rica

ESBL: β -lactamasas de espectro extendido

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

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FEP: Cefepima

FM: Nitrofurantoína

GM: Gentamicina

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

IPM: Imipenem

K: Kanamicina

LANASEVE: Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios

LIA: Agar Lisina Hierro

MEM: Meropenem

NA: Ácido Nalidíxico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción de Cadena de la Polimerasa

PNHNM: Primates No Humanos de Nuevo Mundo

R-V: Rappaport-Vassidialis

SAM: Ampicilina/Sulbactam

ST: Estreptomina

SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol

TE: Tetraciclina

TZP: Piperacilina/Tazobactam

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

UNA: Universidad Nacional

XLT4: Xilosa-Lisina-Tergitol-4

Resumen

La preocupación por las zoonosis y la vida silvestre ha aumentado debido al creciente acercamiento entre la vida silvestre y los humanos como resultado de la expansión humana, la globalización, el cambio climático y las alteraciones en el ecosistema. Pocos estudios describieron el papel de los mamíferos silvestres y los ambientes en la epidemiología de *Salmonella*. A nivel mundial, más de 93 millones de casos de gastroenteritis por año están asociados con *Salmonella* en países desarrollados y en desarrollo. La resistencia a los antimicrobianos es un problema creciente asociado con *Salmonella* que amenaza la salud mundial, la seguridad alimentaria, la economía y el desarrollo en el siglo XXI. El objetivo de este estudio es estimar la prevalencia, identificar perfiles de susceptibilidad antibiótica y serotipos de *Salmonella enterica no tifoidea* recuperada de heces de primates no humanos, alimentos ofrecidos y superficies en diez centros de cautiverio en Costa Rica. Se evaluaron un total de 180 muestras fecales de 10 sitios de manejo, distribuidas en 133 muestras de superficie y 43 muestras de alimentos. Recuperamos *Salmonella enterica* de las heces del 13.9% de las muestras, el 11.3% de las superficies y el 2.3% de las muestras de alimentos. Los perfiles de no susceptibilidad incluyeron seis aislamientos de heces (14.6%): cuatro no susceptibles (9.8%) a ciprofloxacina, uno (2.4%) a nitrofurantoína y uno tanto a ciprofloxacina como a nitrofurantoína (2.4%). En cuanto a los ambientes, un perfil fue no susceptible a la ciprofloxacina (2.4%) y dos a nitrofurantoina (4.8%). El único aislamiento de alimentos resultó pansusceptible. De los aislamientos de heces, el 16% (4/25) coincidieron con los serotipos Typhimurium/14,[5],12:i:-, S. Braenderup/Ohio, S. Newport y S. Anatum/Saintpaul. S. Westhampton se aisló de las

superficies en el 15.4% (2/13) y en el 100% (1/1) de los alimentos aislados. La vigilancia epidemiológica de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos en estos sitios y animales silvestres, así como los patrones de transmisión, pueden favorecer la creación de estrategias para la prevención de la enfermedad y su diseminación. El abordaje de las zoonosis y resistencia antimicrobiana, así como la mitigación de sus efectos requiere un esfuerzo orientado en Una Salud.

Palabras clave: *Salmonella*, primates no-humanos, resistencia antimicrobiana, ambiente.

Abstract

Concern about zoonoses and wildlife has increased due to growing rapprochement between wildlife and humans as a result of human expansion, globalization, climate change and alterations in the ecosystem. Few studies described the role of wild mammals and environments in the epidemiology of *Salmonella*. Globally, more than 93 million gastroenteritis cases annually are associated with *Salmonella* in developed and developing countries. Antimicrobial resistance is a growing problem associated with *Salmonella* that threatens global health, food security, economy, and development in the 21st century. The aim of this study is to estimate the prevalence, identify antibiotic susceptibility profiles and serotypes of non-typhoidal *Salmonella enterica* recovered from non-human primate feces, food offered and surfaces in captive centers in Costa Rica. A total of 180 fecal samples from 10 management sites, 133 surface and 43 food samples were evaluated. We recovered *Salmonella enterica* out of feces from 13.9% of samples, 11.3% from surfaces and 2.3% from food samples. Non-susceptibility profiles included six isolates from feces (14.6%): four non-susceptible isolates (9.8%) to ciprofloxacin, one (2.4%) to nitrofurantoin and one to both ciprofloxacin and nitrofurantoin (2.4%). Regarding the environments, one profile was non-susceptible to ciprofloxacin (2.4%) and two to nitrofurantoin (4.8%). The only food isolate was found to be pansusceptible. Of the isolates from feces, 16% (4/25) coincided with serotypes Typhimurium/14,[5],12:i:-, S. Braenderup/Ohio, S. Newport, and S. Anatum/Saintpaul. S. Westhampton was isolated from surfaces in 15.4% (2/13) and in 100% (1/1) of food isolates. The epidemiological surveillance of *Salmonella* and other zoonotic agents in these sites and wildlife, in addition to the patterns of transmission, can serve for the

creation of strategies for the prevention of the disease and its dissemination. Addressing zoonoses and antimicrobial resistance, as well as mitigating their effects, requires a One Health-approach.

Keywords: *Salmonella*, non-human primates, antimicrobial resistance, environment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Salmonella*

Salmonella es una enterobacteria, Gram negativa, de forma bacilar, ampliamente distribuida a nivel mundial, responsable de causar enfermedad en humanos y animales (Brenner et al. 2000; Ryan et al. 2017; WHO 2018), y asociada a más de 93 millones de casos de gastroenteritis anuales tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Majowicz et al. 2010). Según estimaciones, entre 22 agentes transmitidos por alimentos, *Salmonella* resultó ser el agente con mayor carga transmitida por los alimentos y mayor cantidad de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) con 8.76 millones (95% IC 5.01–15.6 millones), por encima de otros patógenos como Norovirus, *Escherichia coli* enteropatógeno, *Campylobacter* spp., entre otros (Kirk et al. 2015). Su extensa distribución, capacidad de sobrevivir bajo múltiples y adversas condiciones ambientales, tener un rango amplio de hospedadores y múltiples vías de transmisión son características favorecedoras para las infecciones (Pires et al. 2014; Farias et al. 2015; Milton et al. 2018).

El género incluye dos especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. A su vez, *S. enterica* comprende seis subespecies: *S. enterica* subsp. *Enterica*, *S. enterica* subsp. *Salamae*, *S. enterica* subsp. *Arizonae*, *S. enterica* subsp. *Diarizonae*, *S. enterica* subsp. *Houtenae*, y *S. enterica* subsp. *Indica*. Su clasificación engloba más de 2600 serotipos, siendo más de 2000 de relevancia médica (Lahiri et al. 2010; Issenhuth-Jeanjean et al. 2014).

Las salmonelas responsables de causar enfermedades en humanos son divididas en serotipos tifoideos y no-tifoideos. Los primeros se restringen a humanos e

incluyen dos serotipos: *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) y *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A (*S. Paratyphi A*) (Feasey et al. 2012). Las no-tifoideas comprenden cientos de serotipos frecuentemente clasificados como zoonóticos mantenidos en un amplio rango de reservorios vertebrados (Gordon 2011). Los síntomas de salmonelosis comúnmente reportados incluyen gastroenteritis, bacteriemia, neumonía, meningitis e infecciones focales. En los casos de gastroenteritis, los síntomas inician entre seis y 72 horas posterior a la ingesta. La duración de la enfermedad oscila entre dos y siete días; dependiendo de la carga bacteriana, serotipo infectante y estado inmunológico del paciente (WHO 2018). Las cuatro manifestaciones clínicas más importantes de *Salmonella* incluyen: infección invasiva por *S. Typhi*; infección invasiva por *S. Paratyphi A*; infección invasiva por *S. enterica* no tifoidea; y diarrea por *S. enterica* no tifoidea. Las manifestaciones causadas por serotipos no tifoideos son los más comunes (Kirk et al. 2015). En poblaciones inmunocomprometidas, malnutridas, con enfermedades concomitantes, en pacientes pediátricos menores de cinco años y geriátricos se ha reportado un mayor riesgo e índices de mortalidad (Hohmann 2001; Feasey et al. 2012; WHO 2018).

A nivel de especies animales, a menudo *Salmonella* ocurre de manera asintomática (Spickler y Leedom Larson 2013); sin embargo, puede manifestarse clínicamente con diarreas agudas o crónicas, septicemia, enteritis aguda o crónica, e incluso abortos por infección feto-placentaria (Zachary y McGavin 2016). Estos casos clínicos suelen ocurrir cuando los animales enfrentan factores y eventos estresantes como hacinamiento, convivencia con otros animales, transporte, destete, parto, infecciones virales o parasitarias concurrentes, cambios de dietas, cirugías o por

terapias antibióticas que causan disbiosis intestinal (Gopee et al. 2000; Spickler y Leedom Larson 2013; Zachary y McGavin 2016). Algunos pacientes, posterior al cuadro clínico, fallan en resolver completamente la infección y progresan a un estado de portadores (Gunn et al. 2014). *Salmonella* puede acarrear en la vesícula biliar e intestinos, y excretada por heces de forma continua o intermitentemente. Puede mantenerse latente en tejidos linfáticos y movilizarse cuando las defensas del hospedador están comprometidas, actuando como reservorios y favoreciendo la diseminación del agente (Spickler y Leedom Larson 2013).

Los métodos de transmisión de *Salmonella* son múltiples, lo que favorece la infección. La vía de transmisión principal es través de la ruta fecal-oral. Gran variedad de alimentos pueden estar contaminados con *Salmonella*, resultando en la vía de adquisición más importante. Se estima que un 95% del total de casos anuales son transmitidos por alimentos (Majowicz et al. 2010). No obstante, el contacto directo con animales colonizados, indirectamente por contacto con fómites o ambiente contaminado puede resultar en otras vías destacadas de infección (Spickler y Leedom Larson 2013). La transmisión por contacto directo principalmente en espacios como granjas, exhibiciones animales, zoológicos, clínicas veterinarias u otros espacios públicos donde se localizan portadores asintomáticos como animales de abasto, reptiles, roedores y vida silvestre resulta una vía importante y poco reportada. Datos epidemiológicos relacionados a casos clínicos y transmisión de enfermedades por medio del contacto indirecto con animales son poco estudiados y tomados en cuenta en el estudio y abordaje de brotes de enfermedades infecciosas (Hoelzer et al. 2011; Dolejska y Literak 2019). Algunas vías indirectas destacadas son contacto con

alimentos y piensos (Sanchez et al. 2002; Silva-Hidalgo et al. 2012b; Pires et al. 2014), fuentes de agua contaminada (Silva-Hidalgo et al. 2012b), superficies contaminadas (Jang et al. 2008) e incluso por aerosoles (Oliviera et al. 2006).

1. 2 *Salmonella* en Animales Silvestres en Cautiverio

Los animales silvestres son el reservorio de múltiples enfermedades infecciosas zoonóticas que constituyen un desafío para la salud pública (Daszak et al. 2001). La mayoría de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes son zoonóticas e incluyen algún tipo de reservorio silvestre (Woods et al. 2019). Estos han sido vinculados con la transmisión de microorganismos hacia animales domésticos y humanos, por contacto directo y contaminación de ambiente, alimentos y agua, incluyendo la transmisión de *Salmonella* (Kruse et al. 2004). Actualmente ha aumentado la preocupación sobre las zoonosis asociadas a animales silvestres, debido al incremento de acercamiento entre estos animales y los humanos producto de la globalización, cambio climático y alteraciones en el ecosistema (Woods et al. 2019).

Cambios en la eco-epidemiología de *Salmonella* en animales silvestres han sido clasificados como de origen natural o antropogénico (Kruse et al. 2004). Derivado del segundo, Chomel et al. (2007) citan varias acciones con alta repercusión e impacto tales como la expansión humana, cambios en hábitats naturales, cambios en actividades agropecuarias, globalización del comercio, translocación de vida silvestre, mercados de carne de animales silvestres, consumo de alimentos exóticos, desarrollo de ecoturismo, acceso a zoológicos que permiten el contacto con animales y posesión

de mascotas silvestres a nivel doméstico. Estas actividades también ocurren en Costa Rica y de igual manera atentan la salud y estado de conservación de los primates, incluyendo el consumo esporádico de primates (Williams-Guillén et al. 2021; Solano-Rojas, 2021)

La prevalencia de *Salmonella* en mamíferos silvestres es poco conocida y variable, sin embargo, algunos estudios han reportado su aislamiento en centros dedicados al manejo de fauna silvestre en cautiverio (Anexo 1). Es probable que la principal fuente de transmisión hacia estos animales sea a través del consumo de agua o alimentos contaminados y superficies que tienen contacto con roedores, aves, insectos u otros reservorios del microorganismo (Gopee et al. 2000; Jang et al. 2008; Silva-Hidalgo et al. 2012b). Los animales en cautiverio pueden actuar como portadores asintomáticos excretando intermitentemente *Salmonella* en heces e incluso ante situaciones estresantes o enfermedades concurrentes *Salmonella* puede generar enfermedad poniendo en riesgo la conservación de las especies (Smith et al. 2002). Por su parte, portadores asintomáticos resultan preocupantes para la salud pública debido a la potencial capacidad de contaminación de aguas, alimentos y ambiente a los cuales se exponen poblaciones humanas (Jijón et al. 2007; Silva-Hidalgo et al. 2012b; Farias et al. 2015). Estudios previos han mencionado el impacto de *Salmonella* para la salud pública con enfoque en poblaciones de reptiles y anfibios (Erdozain et al. 2013). Hay pocos estudios descritos sobre el rol de mamíferos silvestres y ambientes asociados en la epidemiología de *Salmonella*. Esto es particularmente importante, ya que la exposición directa entre animales portadores representa un riesgo para la salud

de los visitantes y trabajadores de los lugares que manejan animales silvestres *ex situ* o de áreas libres con exposición de estos (Farias et al. 2015; Milton et al. 2018).

Los primates se dividen en cuatro subgrupos: prosimios, grandes simios, primates del viejo mundo y primates del nuevo mundo (Miller y Fowler 2015). En Costa Rica, las áreas silvestres terrestres protegidas representan un 25.44% de los 51.110km² del territorio nacional (SINAC 2019), y albergan cuatro especies de primates no humanos de nuevo mundo (PNHNM). El término formal para el grupo taxonómico que contiene los primates del Nuevo Mundo es *Platyrrhini*. Estos se separaron de los monos y simios del Viejo Mundo (*Catarrhini*) hace unos 40 millones de años y migraron a América. Actualmente viven desde México a Argentina. Son de tamaño mediano y pequeño, viviendo en diferentes ambientes arbóreos (Dunn y Cristóbal-Azkarate, 2016). Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), los monos araña (*Ateles geoffroyi*) y los monos ardilla o titi (*Saimiri oerstedii*) se consideran en peligro de extinción; los monos congo (*Alouatta palliata*) y capuchinos (*Cebus capucinus*) han experimentado reducciones en el tamaño de su población y su distribución geográfica colocándose en la categoría de vulnerables (IUCN 2022).

Destrucción y fragmentación de hábitats, caza, prácticas de agricultura, decomisos de animales silvestres, accidentes automovilísticos, electrocuciones, entre otros, son actividades que en Costa Rica han aumentado el ingreso de animales silvestres a sitios de cautiverio. El manejo normalmente es deficiente debido a la falta de conocimiento, mala infraestructura, fondos insuficientes, personal limitado y poco control gubernamental. El conocimiento del estado sanitario de animales en cautiverio

y su posible impacto para la salud pública es limitado (Jiménez-Soto et al. 2013), incluyendo la eco-epidemiología de *Salmonella*.

Los primates no humanos tienen un alto potencial de transmisión de zoonosis y antropozoonosis, debido a su cercana relación taxonómica con los humanos (Miller y Fowler 2015). Particularmente, la salmonelosis en primates del nuevo mundo, y dependiendo de la virulencia de la cepa bacteriana, se manifiesta como depresión, heces suaves o diarrea hemorrágica, anorexia, fiebre, vómito, siendo la deshidratación la principal causa de muerte, si no es tratada. Portadores asintomáticos no muestran signos clínicos hasta que sufren algún proceso estresante, sufriendo una infección fatal fulminante y excretando un gran número de organismos durante el curso de la enfermedad (Renquist y Withney 1987; Miller y Fowler 2015; Virginia Department of Health 2018). Algunos de los serovares previamente reportados en PNHNM incluyen Braenderup, Oranienburg (Silva-Hidalgo et al. 2012), Yoruba (Knöbl et al. 2011), Typhimurium (Kourany y Rossan 1971; Renquist y Withney 1987), y en otros primates se han reportado Heidelberg, Derby, Miami, Anatum y Stanley (Abee et al. 2012); mismos serovares usualmente reportados en infecciones humanas. Debido a la alta susceptibilidad de primates a sufrir diarrea principalmente asociadas a *Salmonella*, se recomienda exámenes periódicos de las heces de primates y alimentos para la determinación de agentes causales (Miller y Fowler 2015).

La información sobre la frecuencia de *Salmonella* en primates no humanos en cautiverio o espacios similares es escasa. Se ha reportado una prevalencia de 13% de *Salmonella* en primates no humanos de vida libre habituados a humanos en un contexto turístico (Nizeyi et al 2001). Existen estudios que citan prevalencias que van

desde cero hasta 19%; sin embargo, no han sido conducidos en PNHNM, ni en condiciones tropicales de cautiverio (Abee et al. 2012). Otros autores han reportado, en cautiverio en Colombia, PNHNM portadores de *Salmonella* sin síntomas de enfermedad con una prevalencia de 80% (Calderón et al., 2013), lo cual es mucho mayor a lo observado en especies silvestres en cautiverio (Anexo 1) y lo reportado por Abee et al. (2012) descrito anteriormente.

Animales silvestres portadores asintomáticos de *Salmonella* pueden representar un problema de salud pública y la conservación de especies. El personal que trabaja en los centros de acopio, visitantes y otros animales de los recintos son poblaciones en riesgo de contagio, tanto de manera directa como indirecta (Smith et al. 2002; Farias et al. 2015; Milton et al. 2018). Por ejemplo, en 1996 en el Zoológico de Denver en Colorado, 39 niños que asistieron a una exhibición de dragones de Komodo se infectaron con *Salmonella*, aunque ninguna tocó a los animales, la fuente de contagio fue una baranda contaminada que aislaba los animales de los visitantes (Friedman et al. 1998).

El “bushmeat” o caza y consumo de carne de animales silvestres por parte de los humanos es un relevante factor de riesgo que favorece la emergencia de enfermedades zoonóticas (Chomel et al. 2007). El contacto con fluidos y heces durante el sacrificio favorece la transmisión de agentes infecciosos, entre ellos, *Salmonella*. Asimismo, con la globalización y movimiento humano, se facilita la diseminación de agentes mediante el transporte de carne ilegal y de individuos que consumen y se pueden infectar (Ripple et al. 2016). Actualmente en Costa Rica se da la caza ilegal para consumo de carne de animales silvestres (MINAE 2019; SINAC 2019;

Comunicación personal Oficiales del SINAC en el 2022). Si bien, aunque no hay reportes de consumo *per capita* de carne de primates, es una actividad que sucede áreas rurales y urbanas en Costa Rica y Nicaragua, aunque no ocurre de manera frecuente (Williams-Guillén et al. 2021).

1.3 Patogénesis del estado portador de *Salmonella* spp.

La virulencia de *Salmonella* spp. está determinada por su serotipo y capacidad de adherirse al epitelio intestinal e invasión celular (Markey et al. 2013). El objetivo de la bacteria es colonizar la mucosa y acceder a la lámina propia y lechos capilares. El proceso de invasión de *Salmonella* ocurre mediante dos estrategias. En la primera, debido a la ausencia de muco de las células M, *Salmonella* logra el contacto directo con las membranas celulares. Por otra parte, el flagelo le confiere movilidad para atravesar el moco de los enterocitos. Una vez dentro de los enterocitos, se ubican en vacuolas y se multiplican en su interior. Una vez adherida a las células inicia un proceso receptor – ligando y mediante un sistema de secreción de tipo III se estimula la fagocitosis de la bacteria (Zachary y McGavin 2016). Posteriormente migran hacia la lámina propia (Gyles et al. 2008). La otra vía de invasión es mediante macrófagos y las células dendríticas que también tienen la capacidad de fagocitar y movilizar bacterias hacia los vasos linfáticos, tejidos linfoides asociadas a la mucosa y las placas de Peyer (Zachary y McGavin 2016). Utilizando estas estrategias, *Salmonella* se protege de anticuerpos, el complemento y antibióticos, sin causar enfermedad y pasando desapercibida clínicamente (de Carvalho 2014).

1.4 Resistencia Antimicrobiana y *Salmonella* en Animales Silvestres en Cautiverio

La alta frecuencia de *Salmonella* resistente a los antibióticos y su diseminación intra e inter-especies, y su internacionalización ha representado un desafío a la salud pública (Gebreyes et al. 2014; Bakkeren et al. 2019). La resistencia antibiótica comprende principalmente dos escenarios: el desarrollo tarde o temprano de resistencia hacia los antibióticos y la limitada generación de moléculas antibióticas nuevas (Ferri et al. 2017). El amplio uso, mal uso y abuso de los antibióticos, en medicina humana, veterinaria, y agricultura ha permitido la generación de una respuesta evolutiva producto de la presión de selección, permitiendo el surgimiento de los mecanismos de resistencia entre diversas poblaciones bacterianas que se seleccionan, multiplican y producen progenie que reemplaza a la no resistente (García 2001).

Esta emergencia de resistencia va asociada con el uso y consumo de antibióticos por parte del área médica (humana y animal) y actividades de producción de alimentos (agrícola y pecuaria) (García 2001). En el caso de Costa Rica, el sector público en el 2016 reportó un consumo de 30.17 toneladas métricas, con una dosis diaria definida (DDD) de 14.18 por cada 1000 habitantes por día (WHO 2018), lo cual es baja en comparación a países como Brasil (22.75 DDD/1000 habitantes/ día), Bolivia (19.57 DDD/1000 habitantes/ día) Paraguay (19.38 DDD/1000 habitantes/ día) y Canadá (17.05 DDD/1000 habitantes/ día), pero mayor que Perú (10.26 DDD/1000 habitantes/ día). No hay reporte conocido de otros países de la región centroamericana.

Las infecciones resistentes a los antimicrobianos para el año 2019, cobró 4.95 millones (3.62–6.57) muertes asociadas a este escenario (Murray et al. 2022). Se estima que el costo anual por las infecciones resistentes solamente en poblaciones humanas ronda \$2.2 billones por año en E.E.U.U. (Thorpe et al. 2018). Sin embargo, estimaciones económicas actuales de resistencia a antibióticos son de alcance limitado y no tienen en cuenta el más amplio valor social de los antibióticos, por lo tanto, probablemente el verdadero valor económico de la resistencia antimicrobiana es mal estimado (Gandra et al. 2014). El Banco Mundial describe que la resistencia antimicrobiana tiene el potencial de causar daño económico similar o inclusive mayor que la crisis económica del 2008. Podría causar que los países de bajos ingresos en desarrollo pierdan más del 5% de su PIB y empujen a la pobreza a más de 28 millones de personas para el 2050. A diferencia de la crisis financiera del 2008, no habría perspectivas de una recuperación a mediano plazo y el impacto económico de la resistencia antimicrobiana persistiría (World Bank 2016). El problema de la resistencia a los antibióticos no respeta barreras sociales, económicas, biológicas ni geográficas. Para establecer estrategias preventivas y de acción, es esencial la vigilancia de los perfiles de resistencia bacteriana y recopilación de información en forma sistemática (García 2001; Ferri et al. 2017). Se estima que, para el año 2050 la resistencia conduciría a la muerte de 10 millones de personas cada año, con un costo de hasta 100 billones de dólares (Review on Antimicrobial Resistance 2014). El plan de la OMS para combatir la resistencia comprende cinco objetivos: mejorar la conciencia y la comprensión de la resistencia a los antimicrobianos en los responsables políticos y profesionales de la salud; fortalecer la vigilancia y la investigación; reducir infecciones;

fomentar el uso racional de medicamentos en la atención de la salud humana y animal; e incrementar la inversión en el desarrollo de nuevos medicamentos, diagnósticos y vacunas. De ahí que el concepto de Una Salud es la clave para alcanzarlos y disminuir las estimaciones para el 2050 (WHO 2016).

En la última década una variedad de elementos genéticos móviles ha surgido. Entre ellos, plásmidos conferentes de resistencia antibacteriana por medio de genes que codifican enzimas β -lactamasas, como las de espectro extendido (ESBL), y AmpC. Las cuales han sido identificados en bacterias Gram negativas, incluyendo *Salmonella* (Liebana et al. 2013; Madec et al. 2017). Las β -lactamasas son enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos β -lactámicos por hidrólisis, generando como resultado compuestos ineficaces para tratar infecciones bacterianas (Pitout y Laupland 2008). Las ESBL confieren resistencia a una variedad de antibióticos β -lactámicos, incluidas las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, así como monobactámicos, no así a los carbapenems o las cefamicinas. Por su parte, AmpC β -lactamasas son cefalosporinasas que confieren resistencia a las penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda, y de tercera generación, combinaciones de inhibidores/ β -lactamasas, y cefamicin, pero no a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenems. La mayoría de las cepas que producen ESBL y AmpC pueden acarrear otros genes de resistencia a antibióticos comúnmente usado en veterinaria como amoxicilina, sulfonamidas, trimetoprima, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Liebana et al. 2013). La consecuencia en pacientes con infecciones de bacterias acarreadoras de ESBL y AmpC es que se complica la selección de antibióticos de primera línea de tratamiento, y por ende se requieren costosos esfuerzos de control.

Incluso si se selecciona un agente que tenga actividad contra las bacterias *in vitro*, la eficacia clínica no es asegurada (Pitout y Laupland 2008; Liebana et al. 2013). Como resultado de estas preocupaciones, los carbapenems, que han sido ampliamente reconocidos como la clase de medicamentos de primera elección para el tratamiento de infecciones graves causadas por *Enterobacteriaceae* productoras de ESBL, han incrementado en su uso. Estos agentes son altamente estables a la hidrólisis por ESBL, se distribuyen en los tejidos del cuerpo en altas concentraciones y no hay efecto de inóculo. Los posibles inconvenientes de su uso incluyen un alto costo, la necesidad de una vía de administración parenteral, un amplio espectro de actividad que puede promover infecciones con levaduras y bacterias con una selección potencial de variantes resistentes a carbapenem (Pitout y Laupland 2008).

Tanto en casos clínicos humanos, como medicina veterinaria y animales silvestres, la mayor prevalencia de ESBL se encuentran representados por la familia *bla*CTX-M (Guenther et al. 2011; Liebana et al. 2013), en el caso de las AmpC, *bla*CMY-2 es la más prevalente (Liebana et al. 2013). Datos destacan la existencia de reservorios compartidos de genes ESBL y AmpC entre animales y humanos, pero también de plásmidos y clones, lo que sugiere transmisiones cruzadas (Madec et al. 2017). La transmisión de estos elementos se sugiere es por medio de contacto directo o a través de alimentos contaminados principalmente (Liebana et al. 2013). Sin embargo, saber si la transferencia es de animal a humano o viceversa es complejo de dilucidar. Esto porque animales y los humanos pueden albergar genes ESBL y AmpC idénticos pero ubicados en diferentes plásmidos o islas de patogenicidad. Encontrar el mismo clon ESBL o AmpC en animales y humanos no necesariamente prueba la

transferencia directa ya que *Enterobacteriaceae* productoras de ESBL posiblemente estén en el ambiente, siendo una fuente común para animales y humanos (Madec et al. 2017).

De forma natural, los animales silvestres no entran en contacto de manera desmesurada con antimicrobianos (Guenther et al. 2011; Carroll et al. 2015). No obstante, pueden estar colonizados con bacterias resistentes a antibióticos adquiridas a través de alimentos, agua, contacto humano, con otros animales o ambientes contaminados. La colonización de animales silvestres con bacterias resistentes a los antimicrobianos les permite actuar como reservorios, vectores, bioindicadores de resistencia antibacteriana y determinantes genéticos de la resistencia antibacteriana en el ambiente (Carroll et al. 2015), así como comprometer la salud de animales *per se* (Arnold et al. 2016).

Bacterias multirresistentes a antibióticos de importancia pública ya han sido previamente aisladas de animales silvestres en cautiverio y sus ambientes asociados. Por ejemplo, Milton et al. (2018) reportó resistencia en el 43.7% de aislamientos de *Salmonella*, uno de estos aislamientos resultó pentarresistente y otro tetra resistente. Farias et al. (2014) reportó aislamientos de *S. Heidelberg* panresistentes de ambientes asociados a animales silvestres. Molina-Lopez et al. (2015) reporta que, aunque la prevalencia de *S. Typhimurium* es baja en animales de cautiverio en España, la proporción de multirresistencia es alta. En Costa Rica, muestras de *Salmonella* de origen no humano de diversos serotipos han sido analizadas por los laboratorios nacionales de referencia para resistencia antimicrobiana, LANASEVE e INCIENSA, siendo el 2.8% resistentes a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y

ceftazidima) (Bolaños et al. 2014), 33% a ácido nalidíxico y 9.3% a amoxicilina (Comunicación personal Muñoz-Vargas en el 2019).

Trabajos realizados por el Laboratorio de Salud Pública y Alimentos de la EMV, UNA describen resistencia en *Salmonella* para diferentes animales. En vacas de transición se reporta una prevalencia del 27.8% de aislamientos resistentes a nitrofurantoina (n=18) (Huertas-Sánchez 2020). En aislamientos (n=177) cuyo origen fue terneros destinados a planta de cosecha, 75.8% fue resistente a nitrofurantoina y 64.6% a ciprofloxacina (Ismael-Acle 2020). En aislamientos de origen porcino, el 82.2% (n=118) fueron resistentes a nitrofurantoína, 28% a ampicilina, 26% ampicilina/sulbactam, 6.8% a cefotaxima, 5.9% a ceftazidima, 0.8% a cefepima, 11.9% trimetropina/sulfametoxazo, 1.7% a ácido nalidíxico y 7.8% a ciprofloxacina (Jiménez-Madrugal 2022). En matrices relacionadas a producción aviar el 100% de los aislamientos resultaron resistentes a cefazolina y ertapenem, 93.1 % a ácido nalidíxico, 91.1% a cloranfenicol, 94.1% nitrofurantoína, 15.8% a ceftazidima, 65.4% cefotaxima y 1.0% a imipenem y piperacilina-tazobactam (Hernández-Rojas 2022). Este último trabajo representa la mayor diversidad de perfiles de resistencia para *Salmonella* descrito en Costa Rica. No obstante, cepas de *Salmonella* aisladas de primates y su caracterización genómica de resistencia comparativa con aislamientos humanos y otras especies silvestres no han sido evaluadas aún en el país.

2. JUSTIFICACIÓN

Según la OMS, se estima que las diarreas representan la novena causa de muerte globalmente con una proporción de 18.5 muertes por cada 100.000 habitantes (WHO 2018). Dentro de los patógenos asociados a estas diarreas, *Salmonella* no tifoidea encabeza la lista, siendo responsable de 93 millones de infecciones entéricas, 80.3 millones asociadas a alimentos y 155.000 muertes cada año. Para la región de Centroamericana se estiman 229.000 casos y 400 muertes anuales causadas por este microorganismo, con una incidencia de 110 por cada 100.000 personas (Majowicz et al. 2010). *Salmonella enterica* no tifoidea transmitida por alimentos es la responsable de una tasa media de 11 AVAD (95% IC 2-20) por cada 100.000 habitantes a nivel centroamericano (Havelaar et al. 2015). No obstante, las estrategias de vigilancia epidemiológica activa son deficientes a nivel alimentario, ambiental y de salud animal, y los casos humanos reportados no son caracterizados, lo que conlleva a un poco entendimiento de la eco-epidemiología de *Salmonella* en la región.

Entre el 2015 y 2018, Costa Rica registró alrededor de 900 casos clínicos humanos con salmonelosis con una tasa de 4.35 por cada 100.000 habitantes (MINSA 2015; conversación con Duarte en 2018), y se estiman 80 casos no reportados por cada caso confirmado los cuales no son atendidos en centros de salud ni muestreados para confirmación laboratorial (Bolaños et al. 2019).

Desde el punto de vista económico, *Salmonella* representa una enfermedad de importancia por las pérdidas generadas en gastos médicos, disminución de la productividad, pérdidas en industria alimentaria y costos de litigios. Aunado a estas

pérdidas, el escenario para los casos de salmonelosis se complica debido a la ineficacia de las drogas usualmente usadas para su tratamiento, generalmente en casos clínicos sistémicos por (WHO 2018). Para el 2050 y por medio de del abordaje de Una Salud se pretende evitar que 300 millones de personas mueran de manera prematura producto de la resistencia a antimicrobianos (antibióticos, antimicóticos, antiparasitarios, entre otros). Basados en estrategias de investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, vacunas y terapias alternativas, así como el desarrollo tecnológico, análisis de datos, junto con alianzas entre la academia, los clínicos y compañías se espera una disminución de gastos que podrían rondar los 100 billones de dólares (Review on Antimicrobial Resistance 2014).

La resistencia antimicrobiana es un problema asociado a bacterias que amenazan la salud mundial, seguridad alimentaria, economía y desarrollo en el siglo XXI (Gebreyes et al. 2014). Por su parte, la multiresistencia antimicrobiana, considerada como la susceptibilidad disminuida a tres o más familias de antibióticos (Magiorakos et al. 2012), es un fenómeno natural que se expande constantemente y requiere esfuerzos multidisciplinarios. Estos esfuerzos deben ir orientados en contener, mitigar el uso y la propagación de microorganismos resistentes por medio de herramientas educacionales e intervenciones prácticas a nivel de medicina humana, medicina veterinaria y agricultura (Gebreyes et al. 2014; Ferri et al. 2017; WHO 2018). En Costa Rica, los aislamientos clínicos son mayoritariamente pansusceptibles a los antibióticos de uso clínico humano; sin embargo, circulan cepas multiresistentes y/o con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina y ácido nalidíxico, que podrían complicar el manejo de los pacientes. Situación similar sucede en los aislamientos de origen

veterinario (Bolaños et al. 2014; Baldi 2019). Se reconoce la presencia de ESBLs y AmpC presentes en elementos genéticos móviles que confieren resistencia a antibióticos de última línea, lo cual representa una amenaza para la salud pública y animal. Por lo tanto, el establecimiento de infecciones en animales y personas que contengan estos genes de resistencia generan consecuencias como retraso en el inicio de una adecuada terapia antimicrobiana, incremento de la morbilidad y mortalidad, se alargan las estancias hospitalarias y los costos médicos (Liebana et al. 2013). Además, pueden transferirse por estrategias biológicas de conjugación, transformación y transducción hacia la microbiota del hospedero (Bakkeren et al. 2019), tanto en infecciones circulantes en ambientes de comunidad u hospitalarios como infecciones nosocomiales. Por lo tanto, la colonización de ESBL y AmpC en la población general resultan un factor de riesgo previo al uso de antibióticos (Liebana et al. 2013; Ayala et al. 2016; WHO 2018).

Animales silvestres en cautiverio pueden convertirse en reservorios de microorganismos resistentes presentes en las aguas contaminadas, alimentos y ambiente (Jijón et al. 2007; Silva-Hidalgo et al. 2012^a; Farias et al. 2015). La mayoría de los estudios relacionados a salud pública y animales silvestres *ex situ* (fuera de su hábitat natural) que abordan el tema de *Salmonella* se han enfatizado en poblaciones anfibias y de reptiles, y no existe un estudio enfocado en mamíferos silvestres (Farias et al. 2015; Milton et al. 2018), específicamente primates de nuevo mundo, ni los perfiles de resistencia asociados.

Para Costa Rica, la biodiversidad y en especial los primates es uno de los principales atractivos turísticos, inclusive reconocido a nivel mundial como un país en

el que se permite el contacto directo con los primates (Muehlenbein y Wallis 2014). Sin embargo, los temas de salud pública y zoonosis asociadas a primates han sido poco evaluados, por ende, conocer el estado de *Salmonella* en animales y ambiente de centros de conservación *ex situ* es importante para el control de posibles enfermedades de transmisión zoonótica y antropozoonótica.

La caracterización de *Salmonella* y determinación de patrones de resistencia antimicrobiana en animales silvestres en cautiverio es útil para los programas de vigilancia de la enfermedad y monitoreo de patrones a través del tiempo. A partir de la información obtenida se puede generar recomendaciones para la prevención y control de la enfermedad (Smith et al. 2002; Milton et al. 2018). Así, la presente propuesta de investigación de cepas de *Salmonella* en primates y su caracterización genómica de resistencia comparativa con aislamientos humanos, ambiente y alimentos resultará relevante para unir esfuerzos de mitigación, especialmente a través de estrategias de prevención basadas en medidas de bioseguridad, buenas prácticas y educación.

3. HIPÓTESIS

1. Ho: La prevalencia de *Salmonella* en las heces de los primates, sus alimentos y ambiente es menor o igual al 5%.

Ha: La prevalencia de *Salmonella* en las heces de los primates, sus alimentos y ambiente es mayor al 5%.

2. Ho: Los aislamientos recuperados de las tres matrices incluidas en el estudio presentan susceptibilidad a los antibióticos analizados.

Ha: Los aislamientos recuperados de las tres matrices incluidas en el estudio presentan no-susceptibilidad a los antibióticos analizados.

3. Ho: Los serotipos identificados son indistinguibles entre las muestras analizadas.

Ha: Los serotipos identificados son distinguibles entre las muestras analizadas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estimar la prevalencia, identificar perfiles de susceptibilidad a los antibióticos y serotipos de *Salmonella enterica* no tifoidal recuperada de heces de primates no humanos, alimentos ofrecidos y superficies en centros de cautiverio de Costa Rica.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1. Estimar la prevalencia de *Salmonella* en muestras de heces de primates no humanos en cautiverio, alimentos ofrecidos y superficies de contacto en centros de cautiverio en Costa Rica.

4.2.2. Identificar los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *Salmonella* aisladas de las tres matrices de estudio.

4.2.3. Genotipificar los serotipos de *Salmonella* de los aislamientos recuperados por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

5 MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1 Diseño de estudio

Este estudio observacional transversal pretendió estimar la prevalencia de *Salmonella* en heces de primates no humanos de nuevo mundo en cautiverio en Costa Rica, en los alimentos ofrecidos a los mismos y en superficies circundantes que estos habitan. Por tal motivo, se contactaron centros de acopio de animales silvestres que albergan primates en cautiverio de acuerdo con una base datos suministrada por el SINAC.

Durante el proceso de selección de los centros de cautiverio, se envió una carta de invitación para comunicar el objetivo e importancia del proyecto, se explicó la relevancia de su participación, detalles sobre el manejo de las muestras, y la forma de análisis de los resultados obtenidos. El proyecto trabajó con absoluta confidencialidad de manera que se asignó un número a los sitios participantes, esto fue explicado a los encargados, se firmó una carta de compromiso de confidencialidad y consentimiento previamente informado según las regulaciones del Comisión Nacional para la Gestión de Biodiversidad (CONAGEBIO). Se dio un plazo de 15 días a partir del recibido de la carta para emitir su respuesta por escrito y ser incluidos en el estudio. La participación fue voluntaria. Los permisos obtenidos por parte de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad – MINAE corresponden a las resoluciones R-CM-UNA-007-2021-OT-CONAGEBIO & R-CM-UNA-006-2021-OT-CONAGEBIO. El estudio fue sometido a evaluación por parte de la Comisión de Bienestar Animal de la EMV obteniendo la aprobación bajo el oficio UNA-EMV-CBBA-OIFC-002-2019.

5.2 Muestreo

El tamaño de muestra (n) se obtuvo utilizando el programa estadístico WinEpi: Working in Epidemiology (de Blas 2006) considerando una población estimada de 250 (N) primates (Fuentes 2016) y una prevalencia esperada de *Salmonella* spp. en heces de 5%, con 97.5% de nivel de confianza y un margen de error de 2%, resultando en un total de 177 individuos para ser incluidos en el estudio. La prevalencia usada para este cálculo se basó en muestreos preliminares llevados a cabo en animales en cautiverio de centros de rescate de otros países (Anexo 1). Un total de 180 primates fueron seleccionados según el criterio de inclusión que consideró animales aparentemente sanos y sin una terapia de antibióticos en la última semana, sin importar el sexo o la edad, provenientes de centros de cautiverio inscrito ante el MINAE con manejo de PNHNM, y dispuestos a participar según una comunicación escrita de carácter oficial. El muestreo de los sitios fue a conveniencia según la disponibilidad de los centros de acopio con aceptación en participar, hasta alcanzar la muestra calculada. Un muestreo de alimentos ofrecidos a los primates y de tres tipos de superficies se realizó en los centros de acopio incluidos en el estudio considerando las matrices descritas en el Cuadro 1. Estas muestras se obtuvieron el mismo día en que se tomaron las muestras de heces.

Cuadro 1.

Tipos de muestras de alimentos y superficies muestreadas de centros de acopio de animales silvestres que alberguen primates en Costa Rica.

Tipo de muestra	Identificación	Detalle
Superficie 1	Superficies de Contacto Animal	Recinto en el que habitan los primates y sus componentes internos de contacto animal exclusivo.
Superficie 2	Superficies de Contacto Humano	Barandas de seguridad entre animales y persona. Superficies de preparación de alimentos. Zona de contacto exclusivo humano en recinto de los primates (manillas, candados, agarraderas, etc...)
Superficie 3	Superficies de Contacto Mixto	Puertas de recintos y zonas donde haya contacto tanto de personas como de animales. Comederos y bebederos. Zona de examinación médica.
Alimento 1	Alimentos de origen animal	Carne, huevo, insectos, alimento de perro/gato u otros que contengan proteína de origen animal.
Alimento 2	Alimentos de origen vegetal	Hojas, frutas, vegetales y granos

5.3 Método de Muestreo

Heces. De cada primate se recolectaron aproximadamente cuatro gramos de heces. Para ello, los animales fueron restringidos en trampas de contención en su recinto, cuyo espacio fue previamente limpiado. Se esperó que cada primate defecara ahí y se tomó la muestra fecal inmediatamente de la parte superior de forma aséptica con una espátula estéril contenida en la tapa de un frasco estéril de recolección (Nipro Medical, NJ, USA). Las muestras se almacenaron, identificaron y transportaron en hielo al Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional para su procesamiento.

Superficies de contacto. Los tipos de muestras de superficie indicados en el Cuadro 1 fueron recuperadas asépticamente entre dos investigadores mediante el uso de equipo de protección personal. Gasas estériles (Ambiderm, Costa Rica) y remojadas en 10 ml de agua peptonada buferada estéril (APB) (Difco®, Le Pont de Claix, France) se arrastraron sobre las superficies de estudio y fueron posteriormente colocadas individualmente en bolsas estériles (Whirl-Pak®, Madison, WI, USA), identificadas y transportadas al laboratorio siguiendo el protocolo de transporte y conservación descrito anteriormente.

Alimentos. Alimentos ofrecidos a los primates fueron muestreados para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella*. Estas muestras eran recuperadas de manera aséptica utilizando la misma metodología de trabajo que la toma de muestras ambientales. Se recolectaron previo a ser servidas y cada muestra fue colocada en bolsas estériles (Whirl-Pak®, Madison, WI, USA) individuales e

identificadas, siguiendo el protocolo de transporte y conservación descrito anteriormente.

5.4 Procesamiento de muestras

5.4.1 Aislamiento de *Salmonella* en heces

Para la identificación de *Salmonella* en las muestras colectadas, un protocolo estandarizado de cultivo con medios de enriquecimiento selectivo descrito anteriormente por Muñoz-Vargas et al. (2017) fue llevado a cabo. Los cuatro gramos de heces fueron homogeneizados y enriquecidos en 36 mL de caldo de Tetrionato (TTB) (BD Co., Spark, MD, USA) al cual se le agregó yodo en una proporción de 1:20, seguido de una incubación durante 18-24h en baño maría a 42°C. Posteriormente 0.1 mL del inóculo se colocó en 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (R-V) (BD Co., MD, USA); esto se incubó a 42°C, y pasadas las 24h se inoculó en agar de Xilosa-Lisina-Tergitol-4 (XLT-4) (Remel, Lenexa, KS, USA) con una incubación posterior durante 18-24 horas a 37°C. Una sola colonia por plato, negra o negra en el centro con periferia amarilla, compatible con *Salmonella*, fue transferida a platos con agar MacConkey (McK) (BD Co., MD, USA). Las cepas de control incluyeron como positiva a *S. Abaetetuba* (ATCC 35640) como H₂S(+), *S. Cholerasuis* (ATCC 10708) como H₂S(-) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) como negativo, suministradas por el Laboratorio de Bacteriología, EMV, UNA.

5.4.2 Aislamiento de *Salmonella* de gazas de superficies y alimentos

A cada bolsa estéril conteniendo gazas previamente remojadas en APB y los alimentos, se le adicionaron 100 mL de APB e incubaron por 24h a 37°C. De esta

solución, 1mL se inoculó en caldo R-V incubado en baño maría a 42°C durante 24h para posteriormente ser inoculado en XLT-4 e incubado durante 24h a 37°C. Se incluyó un control negativo (gasa estéril) y un control positivo (muestra inoculada con la cepa control de *Salmonella* en heces). Una sola colonia por plato, negra o negra en el centro con periferia amarilla, compatible con *Salmonella*, fue transferida a platos con agar McK para su confirmación y posteriores pruebas confirmatorias.

5.5 Confirmación Fenotípica

Con el propósito de realizar la confirmación bioquímica, colonias con características compatibles con *Salmonella* fueron colocadas en tubos de ensayo conteniendo 5 mL de agar Triple-Hierro-Azúcar (TSI) (BD™, Le Pont de Claix, Francia) y de Agar Lisina-Hierro (LIA) (Sigma-Aldrich, MO, USA), posteriormente incubados a 37°C por 24h. Muestras que generen un perfil bioquímico compatible con *Salmonella*, en la cual se observa una reacción positiva en agar hierro-triple azúcar (La pendiente de la superficie es alcalina-rojo, presencia de H₂S+ negro y fondo ácido-amarillo) y reacción positiva a lisina (tubo se observa morado) (Markey et al. 2013). También se evaluaron serológicamente mediante una prueba de aglutinación visual en vidrio, utilizando un antisuero polivalente contra *Salmonella* (Denka Seiken Ltd., Tokyo, Japón). Una vez confirmadas, 4-5 colonias del cultivo bacteriano fueron transferidos en crioviales estériles conteniendo 3mL de leche descremada en polvo (Oxoid™, Hants, Reino Unido) autoclavada con 750µL de glicerol (Laboratorio Malick, San José, Costa Rica) autoclavado previamente para su congelación a -80°C.

5.6 Identificación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas aisladas con el sistema VITEK® 2

Para cada aislamiento se identificó su perfil de susceptibilidad a los antibióticos por medio del sistema automático VITEK® 2 (BioMérieux, Francia) utilizando las tarjetas AST-N279 destinados para bacterias Gram negativas. Este panel incluyó los antibióticos 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), Ciprofloxacina (CIP), Nitrofurantoína (FM), Colistina (CL) y Trimetroprim/Sulfametoxazol (SXT). Para ello, los aislamientos conservados a -80°C se inocularon en placas de cultivo McK, e incubaron a 37°C por 24h. Posteriormente, una solución de concentración bacteriana al 0.5 según standard McFarland en 3mL de salina estéril al 0,85% (Prelab, San José, Costa Rica) fue preparada, seguida de una transferencia de 145 µL de esta solución a 3mL de salina estéril al 0,85%. Esta segunda solución se utilizó en el sistema VITEK®2 para obtener perfil de susceptibilidad. Los perfiles de susceptibilidad se interpretaron de acuerdo con la norma Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022). Basados en los puntos de corte recomendados por el CLSI en base la concentración mínima inhibitoria, los aislamientos fueron clasificados como susceptibles y no susceptibles (Anexo 3). Los aislamientos con puntos de corte intermedio se interpretaron como no susceptibles. Para fines de este trabajo, se considerarán equivalentes los términos no susceptible y resistente.

5.7 Confirmación Genotípica por medio del gen *hilA*

El gen *hilA* es un gen promotor ubicado en la isla de patogenicidad I de *Salmonella*, que se utiliza para la confirmación genotípica de aislamientos mediante PCR (Cardona-Castro et al. 2002). Con los aislamientos recuperados, se realizó la extracción, purificación y cuantificación de ADN de acuerdo al protocolo establecido en Laboratory Standard Operating Procedure for PulseNet NexTera XT Library Prep and Run Setup for the Illumina MiSeq (CDC 2016). El kit de extracción utilizado fue el Dneasy Blood & Tissue Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), seguido por la detección por medio de la técnica de PCR. Para ello, se siguió un protocolo descrito previamente (Wellcome Trust 2015). Las reacciones consistieron en un volumen final de 22 μ L conteniendo 2 μ L del ADN extraído y purificado, 10 μ L de Master Mix Platinum™ Hot Start PCR (Thermo Fisher, Massachusetts, USA), 1 μ L de cebador F, 1 μ L de cebador R, 4 μ L de potenciador (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) y 6 μ L de H₂O Thermo Fisher, Massachusetts, USA). Las condiciones de termociclaje utilizadas incluyeron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 15 min, 45 ciclos para la desnaturalización y alineamiento de 95°C/60 segundos 55°C/60 segundos, 72°C/ 60 segundos, seguido por una temperatura de extensión de 72°C por diez minutos. Este protocolo de amplificación fue llevado a cabo en un termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems, California, USA), seguido por la visualización de los amplicones mediante la tecnología del QIAxcel Advanced System (QIAGEN, Hilden, Alemania). Controles fueron usados en todas las reacciones, incluyendo ADN de una cepa de referencia de *S. Typhimurium* control positivo. Bandas compatibles con los pesos moleculares esperados (Cuadro 2) fueron identificadas y clasificadas como positivas.

Cuadro 2.

*Cebadores utilizados en el PCR para la identificación del gen *hila* de *Salmonella*.*

Cebador <i>hila</i> F	Cebador <i>hila</i> R	Peso molecular esperado para amplificones (pb)
AGCGTATWGATAATAATCCGG GAT	RTTCCACATTTTCTCGGCA ATAG	88

5.8 Identificación de Serotipos de los Aislamientos Recuperados

Del ADN extraído de los aislamientos, 5 μ L se enviaron al INCIENSA manteniendo la cadena de frío para realizar la identificación del serotipo siguiendo el protocolo descrito por Kim et al. (2006) y sus modificaciones según Jean-Gilles Beaubrun et al. (2012). Este protocolo es utilizado en el CDC y FDA, y permite identificar hasta 30 serovares comúnmente asociados con infecciones clínicas, ambientales y recuperados de alimentos. Brevemente, dos PCR múltiples con cinco pares de cebadores y un PCR múltiple con dos pares de cebadores (Cuadro 3) se realizaron.

Cuadro 3.

Cebadores utilizados en el PCR para la serotipificación de Salmonella enterica.

Cebador 1	Cebador 2	Peso molecular esperado para amplicones (pb)
Reacción 1 STM0716F AACCGCTGCTTAATCCTGATGG STM1350F TCAAAATTACCGGGCGCA STM0839F TCCAGTATGAAACAGGCAACGTGT STM4525F TGGCGGCAGAAGCGATG STM4538F TGGTCAACGCGCGTGAT	STM0716R TGGCCCTGAGCCAGCTTTT STM1350R TTTTAAGACTACATACGCGCAT GAA STM0839R GCGACGCATTGTTGATTGAT STM4525R CTTTCATTGAGCAACTGACGCTG AG STM4538R CGAACGCCAGGTTTCATTGT	187 171 137 114 93
Reacción 2 STY0311 TGGTATGGTTAAGCGGAGAATGG STY0346 GGCTGGAGCAGCCTTACAAAA STY2299 AATCCCCCCCCCTCAAAAA STM3845F ATATCTCATCGTCTCCTTTTCGTGT STY2349F AATTACGGAGCAGCAGATCGAGG	STY0312 GAGAGTCATAGCCCCACACCAA AG STY0347 AAGAGTTGCCTGGCTGGTAAA A STY2300 GGTACACGTTTACTGTTTGCTG GA STM3845R GAAGGTCCGGATAGGCATTCT STY2349R TGCGGCCAGCTGTTCAAAA	301 262 220 181 125
Reacción 3 PT4F GGCGATATATAAGTACGACCATCA TGG STM2150F CATAACCCGCCTCGACCTCAT	PT4R GCACGCGGCACAGTTAAAA STM2150R AGATGTCGTGAGAAGCGGTGG	225 101

Para ello el ADN de cada aislamiento a identificar y de la cepa de referencia S. Typhimurium fue extraído mediante el protocolo citado anteriormente (CDC 2016). Las reacciones consistieron en un volumen final de 25 μ L conteniendo 2 μ L del ADN

extraído y purificado, 0.2 mM de deoxinucleosido trifosfato, 2 mM MgCl₂, 5mM de cada cebador y 3.5 unidades de *Taq* polimerasa contenidos en el Master Mix Platinum™ Hot Start PCR (Thermo Fisher, Massachusetts, USA). Las condiciones de termociclaje fueron las mismas para todas las reacciones: un ciclo de 94°C por cinco min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por un minuto y una temperatura de extensión de 72°C por cinco minutos; llevadas a cabo en el termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems, California, USA). Los amplicones fueron observados bajo la tecnología del QIAxcel Advanced System (QIAGEN, Hilden, Alemania). Bandas compatibles con los pesos moleculares esperados (Cuadro 3) fueron identificadas con la fórmula de serotipo respectivo considerando las proteínas STM0716 (fago integrasa), STM1350 (acil-CoA sintetasa de cadena corta), STM0839 (proteína de membrana interna), STM4525 / 4524 (proteína de especificidad de enzima de restricción hsdS tipo I), STM4538 (PTS permease), STY0311 (proteína secretada probable), STY 0346/0347 (proteína de usuario fimbrial de membrana externa), STY 2299/2300 (rfbH), STM3845 (proteína de membrana interna), STY2349 (proteína hipotética conservada), PT4 (proteína inhibidora de FtsZ) y STM2150 (proteína de membrana externa) (Jean-Gilles Beaubrun et al 2012).

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de la prevalencia de *Salmonella* en las muestras evaluadas de heces, alimentos, ambientes y sus respectivos perfiles de susceptibilidad, utilizando como unidad de análisis el tipo de muestra. Los datos fueron almacenados y organizados en Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Por medio de un análisis de regresión logística se evaluó la significancia de la presencia de *Salmonella* (respuesta dicotómica: positivo o negativo) en heces considerando variables como años en cautiverio, edad, sexo, presencia de diarrea, consistencia de heces, especie y sitio de manejo, esto utilizando Minitab 19® (Minitab, 2010). La variable edad se determinó de acuerdo con características morfológicas como dentadura, tamaño, peso y registros, siguiendo una categorización como infante (menos de un año), juvenil (entre uno y cuatro años) y adulto (mayor a cuatro años). La especie consideró las siguientes: mono titi (*Saimiri oerstedii*), mono cara blanca (*Cebus imitator*), mono araña (*Ateles geoffroyi*) y mono congo (*Alouatta palliata*). La variable sexo abarcó las categorías de hembra y macho. Las variables relacionadas a las heces incluyeron: presencia o ausencia de diarrea (se definió diarrea como heces líquidas o flojas con una frecuencia de más de tres veces por día); consistencia de Heces Normal (heces firmes de consistencia semi sólida y coloración café verduzca) y anormal (lo que no calzara con la descripción de normal). Tiempo en cautiverio se ordenó en cuatro categorías: ≤ 1 año, > 1 año - ≤ 5 años, > 5 año - ≤ 10 años y > 10 año). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Los resultados de la prueba de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas aisladas se categorizaron como

susceptible o no susceptible basándose en los valores de corte para *Enterobacteriaceae* de la guía del CLSI (CLSI, 2022) (Anexo 3).

7. RESULTADOS

7.1 Prevalencia de *Salmonella*

En total 180 muestras de heces de primates no humanos fueron obtenidas de diez sitios de manejo de animales silvestres en cautiverio (Figura 1), 133 muestras de superficies y 43 muestras de alimentos fueron evaluadas para el aislamiento de *Salmonella enterica* no tifoidea. En el cuadro 4, se evidencian las características de la población de primates no humanos incluidos en este trabajo.

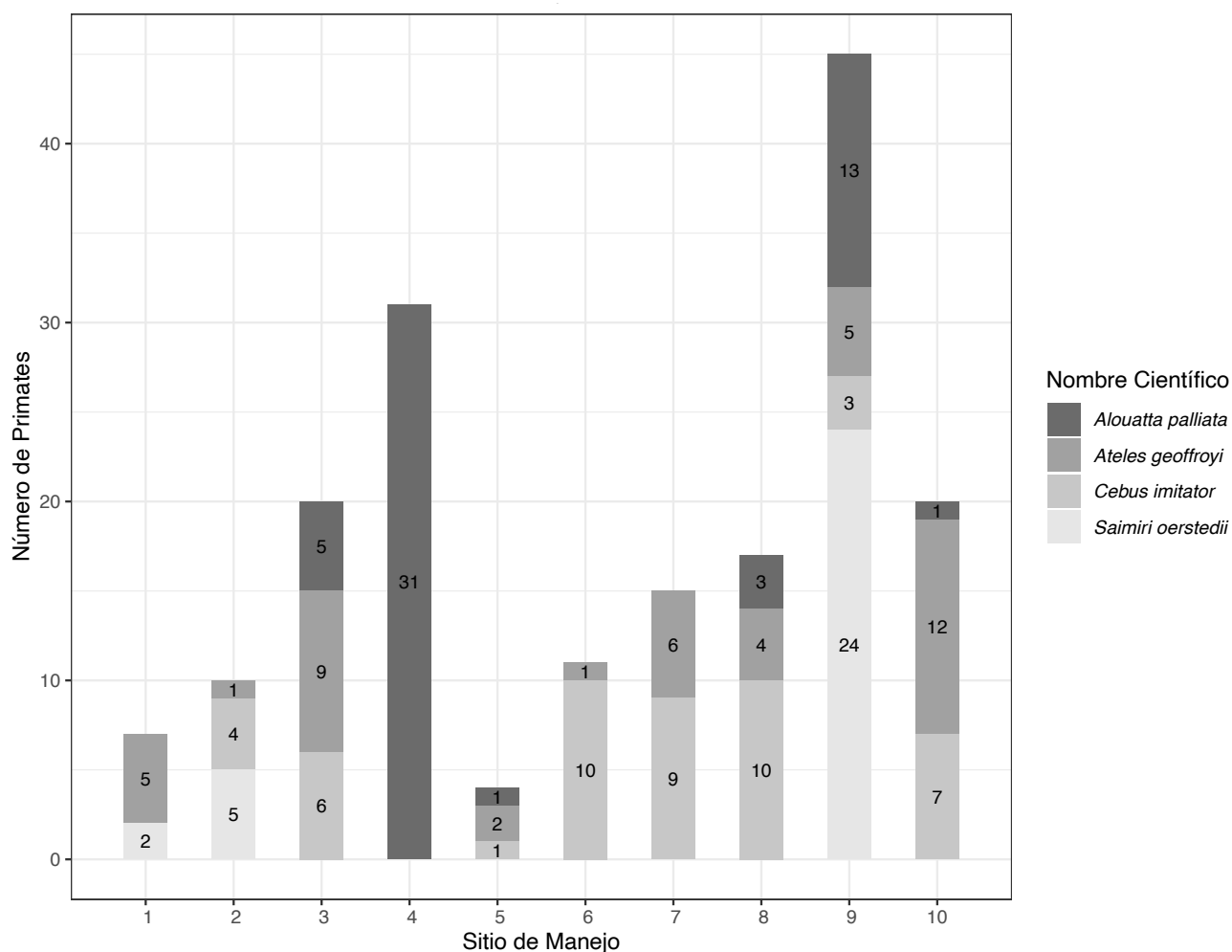


Figura 1.

Primates no humanos muestreados según especie en 10 sitios de manejo.

Cuadro 4

Características de la población de 180 primates no humanos incluidos en el estudio

Característica	Clasificación	n =	Porcentaje (%)	Positivos (% de positivos)	Valor de P
Sexo	Hembra	91	50.6	12 (48%)	0.967
	Macho	89	49.4	13 (52%)	
Etapa de Vida	Infante	18	10.0	2 (8%)	0.972
	Juvenil	20	11.1	1 (4%)	
	Adulto	142	78.9	22 (88%)	
Presencia de diarrea	Si	1	0.5	0 (0%)	0.968
	No	179	99.5	25 (100%)	
Consistencia de Heces	Normal	155	86.1	22 (88%)	0.879
	Anormal	25	13.9	3 (12%)	
Tiempo en Cautiverio	≤ 1 año	36	20.0	4 (16%)	0.832
	> 1 año - ≤ 5 años	40	22.2	8 (32%)	
	> 5 año - ≤ 10 años	53	29.4	8 (32%)	
	> 10 años	51	28.3	5 (20%)	

De las muestras de heces recolectadas, 54 pertenecieron a primates de las especies *A. palliata*, 45 de *A. geoffroyi*, 50 de *C. imitator* y 31 de *S. oerstedii*, con prevalencias de 12.9%, 15.5%, 16% y 9.6% respectivamente para cada especie ($p=0.852$) (Cuadro 5). Las muestras de superficies colectadas se distribuyeron en 49 pertenecientes al grupo de 1 Superficies de Contacto Animal, 45 al grupo 2 Superficies de Contacto Humano y 35 al grupo 3 Superficies de Contacto Mixto con prevalencias 19.5%, 3.8% y 12.8% respectivamente ($p=0.065$) que tienden a ser significantes (Cuadro 6). Entre las muestras del grupo de Contacto Animal y Contacto Humano ($p=0.027$) se observó una diferencia significativa. Mientras que, de alimentos, 11

muestras correspondieron a alimentos de origen animal, 31 de origen vegetal y una mixta con prevalencias del 0%, 3.2% y 0% respectivamente ($p= 0.995$) (Cuadro 7).

Se logró aislar *Salmonella enterica* a partir de heces en el 70% sitios de manejo participantes (7/10), de superficies del 50% de los sitios (5/10), mientras que de alimentos del 10% (1/10) de los sitios.

Cuadro 5.

Frecuencias de Salmonella enterica recuperadas de muestras de heces de primates en diez sitios de manejo de animales silvestres en cautiverio en Costa Rica.

Especies	Sitio de Manejo de Animales Silvestres en Cautiverio										Total (% Prevalencia por especie) ($p=0.852$).
	1*	2*	3	4*	5	6	7	8	9*	10	
<i>A. palliata</i>	-	-	1/5	2/31	0/1	-	-	1/3	3/13	0/1	7/54 (12.9)
<i>A. geoffroyi</i>	2/5	0/1	3/9	-	0/2	0/1	0/6	1/4	0/5	1/12	7/45 (15.5)
<i>C. imitator</i>	-	0/4	0/6	-	0/1	0/10	2/9	3/10	0/3	3/7	8/50 (16)
<i>S. oerstedii</i>	1/2	0/5	-	-	-	-	-	-	2/24	-	3/31 (9.6)
Total	3/7	0/10	4/20	2/31	0/4	0/11	2/15	5/17	5/45	4/19	25/180
(Prevalencia)	(42.9)	(0)	(20)	(6.5)	(0)	(0)	(13.3)	(29.7)	(11.1)	(21)	(13.9)
($p=0.5$)											

*Diferencias significativas fueron observadas entre los sitios 1 y 4 ($p=0.024$), 1 y 9 ($p=0.024$).

Cuadro 6.

Frecuencia de Salmonella enterica recuperada de superficies ambientales en diez sitios de manejo de animales silvestres en cautiverio en Costa Rica.

Tipo de Superficie	Sitio de Manejo de Animales Silvestres en Cautiverio										Total (% Prevalencia por grupo) ($p=0.065$)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1. Contacto Animal*	0/2	0/3	1/7	0/4	0/1	0/2	0/4	0/4	4/7	3/7	8/41 (19.5)
2. Contacto Humano*	0/2	0/5	1/7	0/5	0/4	0/4	0/6	0/2	0/9	1/9	2/53 (3.8)
3. Contacto Mixto	1/3	0/4	0/3	0/2	0/4	0/3	0/1	1/4	2/7	1/8	5/39 (12.8)
Total (% Prevalencia por sitio) ($p=0.097$)	1/7 (14.3)	0/12 (0)	2/17 (11.8)	0/11 (0)	0/9 (0)	0/9 (0)	0/11 (0)	1/10 (10)	6/23 (26)	5/24 (20.8)	15/133 (11.3) Total

*Diferencia significativa se observaron entre Contacto Humano y Contacto Animal ($p=0.027$).

Cuadro 7.

Frecuencia de Salmonella enterica recuperada de muestras de alimentos para primates recolectadas en diez sitios de manejo de animales silvestres en cautiverio en Costa Rica.

Proteína de Origen del alimento	Sitio de Manejo de Animales Silvestres en Cautiverio										Total (% Prevalencia por proteína) ($p=0.898$)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Vegetal	0/2	0/3	1/4	0/2	0/4	0/5	0/3	0/2	0/2	0/4	1/31 (3.2)
Animal	0/2	0/2	0/1	0/2	-	0/2	0/1	-	0/2	-	0/11 (0)
Mixto									0/1		0/1 (0)
Total (% Prevalencia Por sitio) ($p=0.938$)	0/4 (0)	0/5 (0)	1/5 (20)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/7 (0)	0/4 (0)	0/2 (0)	0/5 (0)	0/4 (0)	1/43 (2.3)

7.2 Perfil de susceptibilidad a los Antibióticos

Un total de 41 antibiogramas fueron realizados mediante el sistema automatizado VITEK®2 a la totalidad de aislamientos recuperados. El 78.0% (32/41) resultaron pansusceptibles a los antibióticos sometidos, mientras que 22.0% (9/41) resultaron resistentes al menos a un antibiótico (Cuadro 8).

Cuadro 8.

Frecuencia de perfiles de susceptibilidad basados en los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 41 aislamientos de Salmonella recuperados de heces, alimentos y ambiente.

Antimicrobiano	0.1	0.3	0.6	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	20	32	64	76	128	256	512
Ampicilina								41										
Ampicilina/ Sulbactam								41										
Piperacilina/ Tazobactam									41									
Cefotaxima							41											
Ceftazidima							41											
Cefepima							41											
Imipenem					41													
Meropenem					41													
Amicacina								39	2									
Gentamicina							41											
Ácido Nalidíxico								7	31	3								
Ciprofloxacino					35	6												
Nitrofurantoína											16		21	4				
Colistina						40				1								
Trimetropima Sulfa												41						

CMI obtenida según sistema VITEK® 2. El número dentro de la tabla representa la cantidad de aislamientos según su CMI para cada antibiótico. Líneas negras verticales representan el punto de corte de acuerdo al CLSI (Anexo 3) para la caracterización de susceptibilidad, susceptible hacia la izquierda y no susceptible hacia la derecha. El color verde representa los aislamientos susceptibles y el gris para los no susceptibles. Colistina no tiene color ni línea de punto de corte debido a la ausencia de datos (CLSI 2022).

No hubo aislamientos multi resistentes (resistentes al menos a tres familias de antibióticos) (Magiorakos et al. 2012). Dichos perfiles de no susceptibilidad incluyeron cuatro aislamientos con resistencia a ciprofloxacina, uno a nitrofurantoina y uno a ciprofloxacina-nitrofurantoina en heces de primates. En cuanto a ambientes, un perfil resultó no susceptible a ciprofloxacina, y dos perfiles a nitrofurantoina (Cuadro 9)

Cuadro 9.

Frecuencia de perfiles de resistencia obtenidos a partir del total de aislamientos de Salmonella.

Perfil de Resistencia	CIP	FM	CIP-FM
Porcentaje de Aislamientos	12.2% (5/41)	7.3% (3/41)	2.4% (1/41)

El único aislamiento proveniente de los alimentos resultó pansusceptible. Se identificó un aislamiento no susceptible a colistina con una CMI de 8 μ g/mL por parte el sistema VITEK® 2, por lo que se envió una alícuota de 10 μ L de ADN de este aislamiento al centro nacional de referencia INCIENSA para que ellos llevaran a cabo un PCR que confirmara o descartara la presencia del gen *mcr-1*. El resultado fue negativo para la presencia del gen *mcr-1*.

Se detectaron tres aislamientos pansusceptibles a los antibióticos evaluados que el sistema VITEK® 2 indicó dentro de los resultados de análisis dos observaciones. Dos muestras de *A. palliata* del sitio 4 (Macho y Hembra, Adultos, con seis años de estar en cautiverio, viven en el mismo recinto, sin historia previa de consumo de antibiótico) se indicó como observación “Fenotipo marcado para revisión: Quinolonas

Resistente, Parcialmente resistente”. Una muestra de *C. imitator* del sitio 8 (Adulto, Macho, cuatro años de estar en cautiverio, sin historia previa de consumo de antibiótico) se indicó como observación “Fenotipo marcado para revisión: Aminoglucósidos TOB NET AMI Resistente (AAC(6`))”.

7.3 Caracterización del Serotipo

La caracterización de los serotipos llevada a cabo en el INCIENSA por medio de la técnica de PCR determinó que, entre los aislamientos provenientes de heces, 16% (4/25) coincidieron con serotipos Typhimurium o I4,[5],12:i:- , S. Braenderup/Ohio, S. Stanley, S. Newport y S. Anatum/ S. Saintpaul. 15.4% (2/13) de muestras de superficies y 100% (1/1) de aislamientos de alimentos pertenecieron al serotipo Westhampton. Un total de 83% (34/41) de aislamientos obtuvo un patrón que no coincidió con la referencia de Kim et al. (2006) (Cuadro 10).

Cuadro 10.

Frecuencia de perfiles de susceptibilidad y serotipo identificado en 41 aislamientos de Salmonella recuperada de heces, superficies y alimentos en centros de cautiverio de Costa Rica.

Origen	Total de aislamientos	Serotipo identificado	Perfil Fenotípico de No Susceptibilidad
<i>A. palliata</i>	5	NC	Pansusceptible
	1	Braenderup / Ohio ^x	Pansusceptible
	1	Typhimurium / I4,[5],12:i:- ^x	CIP
<i>A. geoffroyi</i>	3	NC	Pansusceptible
	1	NC	FN
	3	NC	CIP
<i>C. imitator</i>	6	NC	Pansusceptible
	1	Newport	Pansusceptible
	1	Anatum/ Saintpaul ^y	Pansusceptible
<i>S. oerstedii</i>	2	NC	Pansusceptible
	1	NC	CIP-FN
Superficies 1 (Contacto animal)	6	NC	Pansusceptible
	1	NC	FN
	1	Westhampton	Pansusceptible
Superficies 2 (Contacto humano)	1	NC	Pansusceptible
	1	Westhampton	Pansusceptible
Superficies 3 (Contacto mixto)	1	NC	Pansusceptible
	1	NC	FN
	1	NC	CIP
Alimentos Vegetales	1	Westhampton	Pansusceptible
Total	41		

^x Ambos serovares comparten el mismo patrón. ^y Se requiere un PCR STM7 para discriminar.
 NC : No coinciden con ningún patrón descrito

7 DISCUSIÓN

Globalmente, *Salmonella* debido a su potencial zoonótico tiene un impacto directo en la salud humana, la salud animal y el ambiente por lo que la interacción de esos actores y las estrategias de prevención y control deben abordarse bajo la perspectiva de Una Salud. Las múltiples interacciones que cumplen estos actores diariamente continúan siendo un motivo sólido de estudio sobre todo de las implicaciones de salud pública, conservación de especies y salud ambiental relacionado a la resistencia antimicrobiana (Nizeyi et al. 2001; Hoelzer et al. 2011; Gebreyes et al. 2014). *Salmonella* tiene características innatas y factores adquiridos que le permiten la diseminación con una amplia distribución y la colonización de múltiples reservorios con afectación tanto a personas como animales lo cual conlleva a un importante impacto económico y calidad de vida, atentando a la salud pública y la conservación de especies, sumado el emergente problema de la resistencia antimicrobiana. El abordaje de Una Salud es esencial para mitigar los efectos y consecuencias de esta bacteria. Equipos de trabajo transdisciplinarios deben enfocar en implementar y desarrollar soluciones para prevenir, combatir los casos e identificar los reservorios animales, alimenticios y ambientales que pueden estar vinculados a infecciones en humanos o animales.

En Costa Rica y Latinoamérica, previamente a los datos obtenidos en el presente estudio, se carecía de información relacionada a *Salmonella* en poblaciones de primates no humanos, los ambientes *ex situ* donde estos se mantienen y se relacionan con humanos, así como los alimentos que estos consumen y espacios

donde estos se preparan, al menos para el conocimiento de los autores. Se logró recuperar un 11.5% de *Salmonella* del total de muestras procesadas distribuidos en un 13.9%, 11.3% y 2.3% para heces, ambientes y alimentos respectivamente. Se lograron identificar aislamientos resistentes a ciprofloxacina y nitrofurantoina, así como la identificación de serotipos de importancia médica. Uno de los paradigmas de la salud pública y los riesgos asociadas a la interacción humano – primate no humano es la transmisión de enfermedades (Singla et al. 1997). Desde este punto, todas las poblaciones de primates no humanos son de alguna manera influenciadas por los humanos (Fuentes 2012; Struhsaker 1999). Es el humano quien generalmente inicia la interacción con el primate al ofrecer comida, hacer gestos o ruido (McKinney 2014), incrementando el riesgo de transmisión de enfermedades debido a que se fomenta la interacción humano – primate, incluyendo la transmisión de *Salmonella*. El riesgo de contraer una zoonosis producto de estas interacciones son desapercibidas por gran parte de la población. Cuando estos eventos suceden generalmente no se tiene ningún tipo de medida de higiene luego de estas interacciones en la mayoría de los casos, aunado a la falta de consciencia de que los ambientes donde hay animales son uno de los mayores reservorios de enfermedades que se pasan por desapercibidos. Aún existen muchos vacíos de conocimiento por parte de la población acerca de *Salmonella* y sus reservorios.

8.1 *Salmonella* en heces de primates

La prevalencia general de *Salmonella* en heces corresponde a 13.9%. La diferencia de este valor obtenido en comparación con el valor estimado (5%) podría recaer en la ausencia de datos epidemiológicos del agente es un contexto similar. Lo que causó que se usara un valor estimado en base a estudios similares en otras especies. Una característica destacada del presente estudio es la inclusión de la mayor cantidad de primates en cautiverio conocido al menos para la región latinoamericana. Por lo tanto, a pesar de que hay descritos otros estudios que incluyen primates de nuevo mundo, no comprenden una población tan elevada, no son realizados bajo condiciones ambientales e involucrando múltiples sitios de manejo de animales silvestres. Uno de ellos es el descrito por Calderón et al. (2013) en Colombia, con un reporte del 80% de prevalencia (8/10 primates), la cual es mucho más elevada que la encontrada en cualquiera de los centros participantes en nuestro estudio. Esto puede deberse a que el estudio de atribuye la alta prevalencia a un posible brote de *Salmonella* en la colección al momento del muestreo. Otros grupos de estudio lo que han realizado son reportes de casos de *Salmonella* en primates de Latinoamérica sufriendo cuadros clínicos (Kourany y Rossan 1971; Knöbl et al. 2011)

En México, entre el 2007 y 2008, se evaluaron 267 muestras de heces de múltiples especies de animales silvestres en un zoológico, obteniendo una prevalencia general de *Salmonella* del 11.6 % (31/267). Del total positivos, cuatro aislamientos correspondieron a primates de nuevo mundo, un *Ateles geoffroyi* cuyo serovar correspondió a Braenderup, un *Cebus apella* cuyo aislamiento se caracterizó como S.

Derby y dos *Saimiri sciureus* portadores de *S. Oranienburg* (Silva-Hidalgo et al. 2012b). Salvo por el *A. geoffroyi*, las demás especies de primates no se encuentran en el país, aunque si el género. No obstante, la prevalencia real de *Salmonella* en los primates que ese grupo de estudio no se evidencia, debido a que el total de primates muestreados no fue reportado, solo se indicó la cantidad total de animales de diversas especies. Similarmente, *Salmonella* Braenderup también es uno de los posibles serovares encontrado en las heces de un primate en nuestro estudio.

Con relación a otros estudios fuera de Latinoamérica, 63 macacos Rhesus (*Macaca mullata*) muestreados 15 días posterior a su captura y llevados a cautiverio fueron muestreados. No lograron el aislamiento de *Salmonella* spp. y los investigadores sugieren que la colonización en primates cuando ocurre puede estar asociada a las condiciones de cautiverio (Agarwal y Chakravarti 1969). Uno de los mayores estudios de *Salmonella* en primates realizado entre 1964 y 1967 en el Centro Nacional de Investigación de Primates, CA, USA, incluyó 6646 primates de 10 especies (ninguna de las presentes en nuestro estudio). El estudio se dividió en dos partes, entre 1964 y 1966 se obtuvo una prevalencia de 12% evaluando 5076 individuos y en 1967 un 3% evaluando 1570 animales (Good et al. 1969). Este estudio fue el que comprendió la mayor cantidad de individuos y la prevalencia obtenida en la primera parte (12%) es similar a nuestro estudio (13.89%). El Centro Nacional de Investigación en Primates es un sitio donde las medidas de higiene y bioseguridad son muy estrictas y las condiciones en este sitio son muy controladas. Obtener una prevalencia similar a este sitio es un buen parámetro de comparación para nuestro estudio por las condiciones y cantidad de animales incluidos. De igual manera Good et al. (1969)

sugieren que la colonización de *Salmonella* en estos primates es rara vez asociada a cuadros clínicos, anotación que coincide con lo que observamos en nuestro estudio, donde no se requiere la presentación de diarrea clínica para aislar *Salmonella* de heces, sin importar su consistencia.

En Reino Unido, en un periodo de cuatro años, se logró aislar *Salmonella* del 2.7% (17/632) de macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) con diarrea al momento de su ingreso a cuarentena, 0.6% (2/328) con diarrea al momento de cumplir su cuarentena, y 0.2% (3/1670) de individuos clínicamente normales (Tribe y Fleming 1983). Si tomamos en cuenta la categoría de post cuarentena en animales clínicamente normales, podemos decir que esta prevalencia es muy baja en comparación a nuestra prevalencia general, sin embargo, se encuentra dentro del rango de resultados obtenido entre los diferentes centros participantes.

En el 2006 en Korea, Jang et al. (2008) evaluaron un total de 77 primates de 33 especies distintas, incluyendo dos *Cebus capuchinus* (actualmente *C. imitator* en Costa Rica) y un *Ateles geoffroyi* (ambas especies incluidas en nuestro estudio). El restante de primates incluidos correspondió a diversas especies como *Papio anubis*, *Ateles paniscus*, *Macaca radiata*, *Cebus apella*, *Macaca nigra*, *Macaca fascicularis*, *Cercopithecus neglectus*, *Macaca cyclopis*, *Macaca silenus*, *Papio (Mandrillus) sphinx*, *Cercocebus albigena*, *Cercopithecus mona*, *Macaca maura*, *Pongo pygmaeus*, *Erythrocebus patas*, *Macaca nemestrina*, *Macaca mulatta*, *Cercopithecus aethiops*, *Macaca sínica*, *Hylobates lar* y *Hylobates concolor*. En su estudio todos los primates resultaron negativos a *Salmonella*. A diferencia de nuestro estudio, los investigadores

incluyeron solamente la población de primates de un único centro de rescate, y a pesar de que esta población fue mucho mayor que cualquiera de los centros en nuestro estudio, su prevalencia fue nula. A diferencia de los centros en Costa Rica, en los cuales los que albergaban más de 11 primates tuvieron más de un animal positivo. En nuestro trabajo las prevalencias para las especies *Cebus imitator* y *Ateles geoffroyi* fueron de 16 % y 15.5 % respectivamente. Son más elevadas las reportadas en esta tesis que en el trabajo de Jang et al. (2008) no obstante, hay que tener en cuenta que se muestrearon muchos más individuos de estas especies por lo que pudo haber influenciado la sensibilidad del muestreo.

A pesar de que estas prevalencias previamente descritas difieren en tipo de estudio, características y manejo de los primates, especies de primates, cantidad de animales, ubicación geográfica y metodología de procesamiento, hay estudios con prevalencias mayores, menores y similares a la encontrada por nuestro grupo de estudio, sin embargo el estudio con la mayor cantidad de primates muestreados (Good et al. 1969) es similar a los valores obtenidos aquí. Además, los reportes de *Salmonella* en colecciones de primates establecidas son poco frecuentes, siendo encontrados con mayor frecuencia reportes de brotes diarreicos de los años ochentas (National Research Council (US) Committee on Occupational Health and Safety in the Care and Use of Nonhuman 2003; Abee et al. 2012). Actualmente la presión sobre el bienestar animal, mejores condiciones de higiene y bioseguridad ha llevado beneficiar el manejo y el control sobre las enfermedades infecciosas.

La prevalencia de patógenos en la vida silvestre puede impactar en la frecuencia de casos de salmonelosis en humanos y otros animales (Jijón et al. 2007). Los brotes por *Salmonella* en sitios de manejo de fauna silvestre son infrecuentes, poco reportados y desconocidos en muchos casos. Los visitantes y trabajadores poseen un mayor riesgo de salud por el contacto directo e indirecto con los animales asintomáticos (Jang et al. 2008).

Los estudios que describen *Salmonella* en primates *ex situ* previamente citados, no hacen referencia a características de la población como sexo, etapa de vida, tiempo en cautiverio, cantidad de animales con los que vive, ni otras características como agentes infecciosos presentes en su ambiente o factores de manejo, lo que representa un déficit para la comparación más profunda de resultados o el conocimiento de la epidemiología de *Salmonella* en esas poblaciones. Además, resultados negativos a la identificación por cultivo se deben interpretar en que los animales en el momento del estudio no excretaban *Salmonella* (Ketz-Riley 1986).

8.2 *Salmonella* en muestras ambientales.

Salmonella en sitios de manejo de animales silvestres se encuentra poco reportada. La transmisión indirecta de este patógeno a partir de superficies es desconocida en muchos casos y subestimada (Farias et al. 2015). La presencia de *Salmonella* en heces y ambientes podría sugerir contaminación ambiental de los primates hacia el ambiente, por contacto directo e indirecto con las excretas. No obstante, al ser estos ambientes abiertos y en los cuales se observó la presencia de potenciales vectores como roedores, aves, insectos, fómites y personas, el origen

puede ser múltiple. Estos ambientes restringidos en conjunto con sistemas de drenajes deficientes favorecen la presencia de patógenos (Richter y al-Sheddy 1990).

El ambiente puede funcionar como reservorio de *Salmonella*, favoreciendo la colonización de múltiples hospederos (MacKenzie et al. 2017) entre ellos trabajadores, visitantes, otros animales de la colección e incluso animales de vida libre que se acercan a estos espacios. Microorganismos patógenos y resistentes tienen la habilidad de sobrevivir en ambientes. Cuando los animales entran en contacto con estos ambientes contaminados puede resultar en el intercambio de agentes microbiológicos con potencial patogénico y puede propiciarse el intercambio de elementos genéticos móviles que las bacterias utilizan como factores de virulencia o resistencia a fármacos (Lessa et al. 2011). Para realmente saber si los aislamientos ambientales y de heces son las mismas cepas se necesitan técnicas moleculares que este estudio no abarca. Sin embargo, aun así es muy difícil de concluir cuando se estudia vida silvestre y ambientes en qué dirección se dio la transmisión del microorganismo (Vittecoq et al. 2016). Es decir, si el animal excretó la bacteria al ambiente en cautiverio o si el animal la adquirió desde el ambiente u otra fuente.

La prevalencia obtenida de las muestras ambientales de aproximadamente 11.3% es similar en comparación al estudio de Farias et al. (2015) en sitios de manejo de animales silvestre localizados en Ohio, USA. Sin embargo, entre los centros involucrados en el presente estudio se observaron variaciones de las frecuencias entre un 0 y 26% las cuales podrían atribuirse a condiciones ambientales, presencia de vectores o portadores, tipos de superficies, medidas de higiene y de bioseguridad. No

obstante, en este estudio no se incluyeron estas características como variables de análisis. De acuerdo a la literatura, como factor principal de riesgo se incluye el estado de la superficie y sus condiciones de porosidad, humedad, irregularidad y corrosión (Moore and Griffith 2002), resaltando que la sequedad de las superficies puede tener efecto directo en la sobrevivencia de agentes bacterianos. En este estudio en particular fue incluido el muestreo de barandas y jaulas de aluminio, las cuales en su mayoría se encontraron secas y expuestas a radiación solar directa, lo que afectó posiblemente la supervivencia y recuperación del agente. Aun así, la prevalencia de *Salmonella* en superficies de contacto animal y de la interfaz humano-animal fue significativamente mayor que las superficies restringidas a contacto humano en donde había medidas de limpieza más rutinarias. La carga biológica de microorganismos presente en la superficie y sustancias que estos producen como metabolitos e incluso antibióticos incide también en la capacidad de recuperar el microorganismo deseado ya que en el ambiente se encuentran en constante interacción y competencia (Ali et al. 2015; Bell et al. 2016).

Durante el muestreo varios factores pueden impactar el resultado en la recuperación de *Salmonella* incluyendo la carga bacteriana ambiental, la manipulación y presión durante el arrastre de la gasa con posible lesión de la membrana celular, el tiempo de contacto de la gasa en la superficie, el tiempo de transporte y el área de muestreo (Rawlinson et al. 2019). En este estudio, el tiempo de transporte desde el muestreo hasta el procesamiento de la muestra en el laboratorio se trató de reducir a lo menos posible, no obstante, por la distribución geográfica de los sitios, el rango de tiempo varió desde las dos horas a las seis horas aproximadamente. En cuanto al área

de muestreo hubo variaciones dependiendo de las infraestructuras de cada lugar; generalmente las de contacto humano eran mucho menores en comparación a los de ambientes mixtos o los ambientes exclusivos de animales, estos últimos resultando en los de mayor área. Esto pudo influir en los resultados, donde hubo mayor frecuencia de *Salmonella* en espacios de contacto animal que en áreas restringidas a contacto humano ($p=0,027$).

Estos factores pudieron influir en que el porcentaje de recuperación bacteriana en superficies haya sido tan bajo e incluso nulo en algunos sitios aun cuando un portador se encontraba en el recinto. Uno de los puntos más importantes es que al realizarse los muestreos con previo aviso, en muchas ocasiones les permitió a los participantes limpiar las superficies y evaluar su método de limpieza, principalmente recintos de examinación clínica y cocina. Cabe resaltar un hallazgo de importancia en el sitio 8, el cual presentó un aislamiento en el área de clínica a pesar de que no atendían animales ahí desde hace muchos meses, por lo que se encontraba en abandono y se podría atribuir a que el aislamiento fue acarreado por un vector (posiblemente un roedor o insecto). En el sitio 9 se aisló *Salmonella* de la cocina. Inmediatamente confirmado el aislamiento se notificó a los responsables y enseguida realizaron una acción de corrección. La encargada de la cocina tenía conocimientos de higiene y manipulación de alimentos, entonces cerró la cocina, realizó una limpieza y desinfección profunda de superficies y utensilios. Finalmente, aunque el método utilizado en nuestro estudio para el aislamiento de *Salmonella* es considerado el “gold standard”, diferencias en la recuperación de este microorganismo pudieron deberse a la cepa circulante, la cual podría presentar variaciones de virulencia o resistencia, con

más susceptibilidad a la desecación u otras condiciones ambientales (Rawlinson et al. 2019).

8.3 *Salmonella* en los alimentos evaluados.

Los alimentos que ofrecieron los sitios participantes variaban. Los más frecuentes incluían frutas, vegetales, huevo, carne de pollo, carne de ternero, insectos, alimento seco para perro, alimento húmedo para gato y lácteos. Estos alimentos anteriormente se han descrito como fuente de *Salmonella* (Almeida et al. 2013; Molina et al. 2016). La comida en estos sitios raramente es evaluada a nivel microbiológico aun cuando las afecciones gastrointestinales ocurren con bastante frecuencia (Richter y al-Sheddy 1990). Los alimentos pueden actuar de manera clave en la transmisión de microorganismos por manipulación deficiente e inadecuadas medidas de higiene. Farias et al. (2015), reportaron una prevalencia de *Salmonella* en alimentos del 15.8 % (6/38). Tres de estos aislamientos pertenecían al serovar Heidelberg, cuyo perfil de sensibilidad incluía resistencia a los antibióticos AM-ST-TE-K-GM. Los otros tres fueron *S. Agbeni* de perfil pansusceptible a los antibióticos evaluados. Este hallazgo representa una frecuencia mayor a la identificado en nuestro estudio, así como un aislamiento multirresistente y con serotipos descritos asociado a brotes con hospitalizaciones en USA (CDC 2018). En India, el 3.8% (1/26) de los alimentos evaluados en estos sitios resultaron positivos, correspondiendo al serovar Kentucky, cuyo perfil de resistencia resultó pansusceptible, hallazgo similar al nuestro. En México se evaluaron 22 muestras de alimentos ofrecidos a animales silvestres en cautiverio. No hubo aislamiento en ninguna de las muestras (Silva-Hidalgo et al. 2012b)

coincidiendo con el resultado obtenido de la mayoría de los centros (9/10). Estos estudios citados resaltan la importancia de los muestreos de *Salmonella* en alimentos ya que pueden ser fuente de transmisión para animales en cautiverio.

Debido a la transmisión de la bacteria por medio de alimentos se ha causado la muerte de individuos. Se resalta la importancia de aplicar las mismas medidas de inspección, higiene y manipulación de alimentos a la que se someten los alimentos destinados a personas. Ya que, cuando un animal es colonizado con *Salmonella*, representa un riesgo para su propia salud, la salud pública, la conservación de otros animales en el sitio de manejo *ex situ* y salud ambiental (Ocholi et al. 1987; Silva-Hidalgo et al. 2012b). *Salmonella* puede acarrear elementos genéticos móviles que confieren resistencia y mecanismos de virulencia que favorezcan la multiresistencia y también transmitirse por alimentos (Hammerl et al. 2018). Esto representa un factor de riesgo ya que complica el tratamiento de enfermedades transmitidas por alimentos o puede convertir a estos animales en reservorios de estos elementos.

Actualmente ha crecido la preocupación alrededor de enterobacterias como *Salmonella* asociadas a frutas y vegetales debido al incremento de aislamientos y reportes de brotes de enfermedad asociados a estos (Lenzi et al. 2020). Uno de los mecanismos descritos que favorece la transmisión es que bacterias patógenas usan sus fimbrias y la celulosa para fijarse a la superficie de plantas lo que les permite mantenerse en estos alimentos (Bintsis 2018). Aunque no se realizó una cuantificación de *Salmonella* en el alimento del cual se obtuvo el aislamiento, está descrito que se requiere una cantidad muy baja de microorganismos (1×10^1 - 1×10^5) para causar

enfermedad (Bell et al. 2016). Los vegetales crudos tienen el riesgo de contaminación previo a la cosecha cuando hay factores como el riego con aguas contaminadas, desechos mal manejados, heces de producciones pecuarias utilizadas para el abono de tierras, heces de vida silvestre o animales domésticos que contaminan cultivos. Durante la cosecha, los riesgos suelen presentarse en el transporte, procesamiento, distribución y comercio de los productos hasta el punto final de consumo (Mritunjay y Kumar 2017). En este caso de estudio, todos los alimentos sufrieron manipulación previo al muestreo, lo que se encuentra descrito como un factor de riesgo que favorece la contaminación (Ehuwa et al. 2021). Aun así, dada las múltiples fuentes de alimentos incluidos en las muestras compuestas, la prevalencia de *Salmonella* obtenida fue relativamente baja.

La contaminación microbiológica ambiental representa un desafío actual al ser un medio de contaminación para los alimentos ofrecidos a animales (Bintsis 2018). Durante el muestreo, un comportamiento observado frecuentemente correspondió a primates que consumían sus alimentos después de que estos habían caído al suelo y espacios contaminados con materia fecal. Era común observar que un primate tomara un alimento recién servido y si no se lo acababa lo tiraba, posteriormente otro primate o incluso el mismo en algún momento llegaba y al menos lo probaba o se lo terminaba de comer. Este es uno de los desórdenes de comportamiento se da principalmente en cautiverio al tener un espacio limitado, donde la alimentación y la deposición de sus excretas ocurren en la misma área. Esto puede favorecer la transmisión de enfermedades entre individuos en un mismo recinto. Sobre todo, si se introduce un animal al recinto y no se le realizan exámenes de heces para conocer su estatus.

La alimentación es clave para mantener la salud y superar las infecciones. De esto depende ofrecer alimentos de buena calidad y en cantidades adecuadas (Nelson et al. 2002). Al evaluar las propiedades organolépticas (salvo por sabor y siempre utilizando guantes limpios para evitar contaminación) se pudo determinar que los alimentos se encontraban en un buen estado, incluso al nivel de poder destinarse a las personas. Contaban con una buena textura, olor normal, colores normales del fruto, vegetal o carne y brillo adecuado. Incluso en algunas ocasiones eran sometidos a algún tipo de procesamiento térmico que favoreciera su ingesta y redujera la carga microbiológica, lo que eventualmente se puede ver reflejado en la baja prevalencia encontrada en esta matriz. En este estudio la única muestra de alimentos positiva contenía alimentos vegetales frescos (pepinos, hojas de árboles y sandía). Los alimentos frescos a diferencia de otros que sufren un proceso de cocción pueden contener patógenos como *Salmonella* por lo que las infecciones y brotes asociados a estos son frecuentes (Gupta et al. 2007). Actualmente la seguridad microbiológica de los productos frescos como frutas, vegetales y hortalizas ha incrementado la preocupación en todo el mundo representando un riesgo para la salud (Gajraj et al. 2012).

Similar a las superficies, diferentes factores pueden repercutir en la recuperación de bacterias de alimentos entre ellos: el organismo y la cepa que se pretende aislar, el nivel de contaminación, el medio y la marca, la absorción de las células al método de muestreo, la presión y tiempo de contacto, la topografía y tipo de superficie, la humedad/sequedad de la superficie, el método de transporte de la

muestra, daño celular y estresantes ambientales, número de muestras y uso de la superficie (Rawlinson et al. 2019).

8.4 Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de aislamientos obtenidos.

La totalidad de 41 aislamientos de *Salmonella* recuperados en este estudio fueron expuestos para la determinación de los perfiles de susceptibilidad a antibióticos mediante el sistema automatizado VITEK®2. De estos, el 78.0 % (32/41) resultó pansusceptible a los 15 antibióticos evaluados, mientras que los restantes (9/41) resultaron resistentes al menos a un antibiótico, sin exhibir perfiles de multirresistencia, entendida como resistencia al menos a tres familias de antibióticos (Magiorakos et al. 2012). Esto concuerda con estudios previos de vida silvestre en condiciones *ex situ* donde la baja frecuencia de uso de antibióticos comparado a otros sitios de manejo de animales como producciones pecuarias primarias y hospitales veterinarios donde el consumo de antibióticos es mucho mayor (Milton et al. 2018). Los perfiles de no susceptibilidad correspondieron a cinco aislamientos con resistencia a ciprofloxacina, uno a nitrofurantoina y uno a ciprofloxacina-nitrofurantoina en heces de primates. En cuanto a ambientes, un perfil resultó no susceptible a ciprofloxacina, dos perfiles a nitrofurantoina (Cuadro 9) y uno se identificó como no susceptible a colistina, teniendo una CMI de 8mg/mL. Debido a que esta tecnología tiene limitaciones para evaluar la no susceptibilidad de este antibiótico, se remitió dicho aislamiento al Centro Nacional de Referencia de Bacteriología de INCIENSA para su confirmación genómica por medio de la técnica de PCR. Para ello, una alícuota de 10µL de ADN de este aislamiento a una concentración de 69.4ng/mL fue remitida. El resultado de esta

prueba dio negativo para la presencia del gen *mcr-1*, por lo tanto, un resultado negativo de no susceptibilidad a colistina. El único aislamiento proveniente de los alimentos resultó pansusceptible.

De los animales positivos a *Salmonella*, solo el 4% (1/25) había sido tratado con el antibiótico ceftiofur, una cefalosporina de tercera generación, sin embargo, el antibiograma fue susceptible a este fármaco. De los aislamientos no susceptibles al menos a un antibiótico, ningún individuo reportaba haber recibido antibioticoterapia. Sin embargo, este punto debe ser evaluado teniendo en cuenta que puede haber un sesgo de información suministrada. Aunque los animales silvestres es poco probable que sean tratados con una terapia antibiótica, cuando ingresan a uno de estos sitios de rescate es porque en su mayoría tienen alguna afectación de la salud, que en ciertos casos requieren el uso de antibióticos. En estas condiciones hay un incremento de interacciones con personas y otros animales eventualmente tratados con antibióticos o colonizados con bacterias resistentes, lo que favorece la transmisión de bacterias resistentes y mecanismos de resistencia (Plaza-Rodríguez et al. 2021).

De los ambientes y alimentos, el 18.8% (3/16) de las muestras resultaron resistentes al menos a un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas o nitrofuranos. En este estudio, la superposición de espacios podría servir como áreas donde estas bacterias resistentes y mecanismos de resistencia pueden intercambiarse. Al mantenerse en cautiverio, actividades como la alimentación, limpieza de recintos, mantenimiento de instalaciones y diseño e implementación del enriquecimiento ambiental requieren el ingreso de personas a los recintos, este ingreso puede venir acompañado de bacterias resistentes o con potencial patógeno. Por otra

parte, debido a la arquitectura implementada y los requerimientos ambientales, los espacios en estos recintos son abiertos. Vectores como insectos, reptiles, roedores y aves pueden movilizar bacterias al ingresar y salir de los mismos.

El antibiótico al cual presentaron mayor resistencia resultó ser la ciprofloxacina. Este es un antibiótico utilizado para el tratamiento de salmonelosis en humanos (Shane et al. 2017). El Sistema de Monitoreo Nacional de la Resistencia Antimicrobiana Estadounidense (NARMS) y el Comité Europeo de Evaluación de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) han reportado al alza los aislamientos no susceptibles de *Salmonella* (Fang 2015; Karp et al. 2017). Incluso la OMS lo asignó como uno de los patógenos de alta prioridad de investigación, y se ha mencionado que la resistencia de *Salmonella* a este antibiótico amenaza las opciones de tratamiento en pacientes humanos (Cuypers et al. 2018). En Costa Rica, fluoroquinolonas como la enrofloxacin son ampliamente usadas en la medicina veterinaria como opciones de tratamiento y de manera profiláctica en primates y otros animales domésticos. Asimismo, a nivel mundial también hay un alto uso de fluoroquinolonas, entre ellos ciprofloxacina, que aunque no es una elección de primera línea se usa de esta manera (Redgrave et al. 2014). El mecanismo de resistencia más frecuente en fluoroquinolonas se presenta en los genes que codifican los blancos de esta antimicrobiano, las topoisomerasas tipo II (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*). Las mutaciones en las regiones de estos genes codifican la resistencia a las fluoroquinolonas y se conoce como región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR por sus siglas en inglés) (Yoshida et al. 1990; Yoshida et al. 1991; Redgrave et al. 2014). Asimismo genes como los *qnr* también se encuentran descritos reduciendo la susceptibilidad a fluoroquinolonas en distintas

enterobacterias, incluyendo *Salmonella*. Estas también previenen que las quinolonas se adhieran a las topoisomerasas (Cattoir et al. 2007).

Salmonella resistente a fluoroquinolonas también se ha aislado de animales de producción (Ismael-Acle 2020; Huertas-Sánchez 2020; Jiménez-Madrigal 2022; Hernández-Rojas 2022) así como mapaches (Baldi et al. 2019) en Costa Rica. El informe de vigilancia de Costa Rica reporta 7.7 % (19 / 248) de los aislamientos durante este periodo como no susceptibles a ciprofloxacina (Tijerino Ayala et al. 2020). El incremento de estos aislamientos requiere un abordaje desde la perspectiva de Una Salud para monitorear donde se están creando, la diseminación y determinar nichos de contagio (Cuypers et al. 2018).

La nitrofurantoina resultó ser el otro antibiótico al cual los aislamientos resultaron no susceptibles. Es un antibiótico de amplio espectro, especialmente usado para el tratamiento de infecciones urinarias y de manera tópica en heridas (Guay 2001). Se ha usado en medicina veterinaria, principalmente como promotor de crecimiento en ganadería. En 1995 la Unión Europea cesó su uso debido a la presencia de residuos con propiedades carcinogénicas en productos alimenticios. *Salmonella* a pesar de ser naturalmente sensible a este antibiótico, en los últimos años se ha incrementado el reporte de aislamientos resistente en Europa (García et al. 2017) y en aislamientos animales en Costa Rica (Ismael-Acle 2020; Huertas-Sánchez 2020; Jiménez-Madrigal 2022; Hernández-Rojas 2022). En Costa Rica este medicamento está registrado para el uso en humanos (MINSA 2021). El Sistema De Medicamentos Veterinarios del SENASA no contiene ningún registro de la molécula. No obstante, el uso extra-etiqueta de este medicamento en Costa Rica sucede en el ámbito veterinario.

En Europa, a pesar de su prohibición hace mucho tiempo, se ha descrito que la resistencia a este antibiótico por parte *Salmonella* es capaz de mantenerse en el tiempo, principalmente en los genes *nfsA* y *nfsB* (García et al. 2017). Dos presuntos escenarios que podrían explicar los aislamientos resistentes que proviene de animales sin historia previa de uso de este tipo de antibióticos es que la resistencia se haya mantenido en el tiempo en ambientes y diseminado a través de aguas, alimentos o el ambiente. Otra posibilidad es que haya pasado desde humanos o u otro animal portador, a través de contacto directo o indirecto. No obstante, establecer la temporalidad de la infección y diseminación de *Salmonella* resistente a la nitrofurantoína en a estos escenarios queda por ser estudiada a más profundidad en futuros estudios.

El sistema VITEK® 2 identificó un aislamiento con una concentración mínima inhibitoria para colistina de 8 µg/mL, no obstante, este no es el método apropiado para evaluar la sensibilidad de este antibiótico (CLSI, 2022). Del ADN extraído para la confirmación genotípica de este aislamiento, una alícuota de 10µL se envió al INCIENSA con el objetivo de identificar o descartar la presencia del gen *mcr-1*, el cual es uno de los responsables de conferir resistencia a las polimixinas. Los genes *mcr* se encuentran en plásmidos, estos se puede compartir y diseminar fácilmente entre bacterias (Liu et al. 2016). El resultado del PCR para la identificación de este gen fue negativo lo que descarta que este mecanismo sea la causa de este resultado. Distintos genes *mcr* pueden estar involucrados en el mecanismo de resistencia, sin embargo, de acuerdo con lo expresado por el INCIENSA es que se les ha dificultado obtener

controles positivos, por lo tanto, no los realizan. Otros mecanismos de resistencia a la colistina en Gram negativas incluyen mutaciones cromosómicas. Estas comprenden modificaciones de lipopolisacáridos (LPS), pérdida del LPS, mutaciones de porinas y sobreexpresión de bombas de eflujo, sobreproducción de polisacárido capsular (PSC) que ocultan los sitios de unión y atrapan polimixina, e inactivación enzimática de polimixinas (Lentz et al. 2021). La confirmación de la resistencia a colistina sin importar el mecanismo de resistencia a este antibiótico es por medio de métodos fenotípicos como la micro dilución en caldo, metodología de referencia recomendada por CLSI (CLSI 2022).

Los genes *mcr* han sido reportados en otros animales de zoológico en Brasil (Cocodrilos y mapaches) y ambientes en los que estos se encuentran (dos Santos et al. 2020); asimismo, en una amplia variedad de bacterias incluida *Salmonella*. Aunque el tratamiento de esta bacteria con colistina no es una primera opción, la transferencia horizontal de genes hacia otras bacterias comensales y patógenas es de suma relevancia (Luo et al. 2020) y la presencia de estos genes se considera un factor de riesgo para la exhibición de multirresistencia a diversas familias de antibióticos lo que genera un gran impacto contra la salud por darse limitantes terapéuticas (Javed et al. 2020). Los genes *mcr* puede estar presentes en bacterias que presentan susceptibilidad a la colistina, lo que permite que persista sin detectarse (Lima et al. 2019) y exista el riesgo de diseminación por plásmidos a cepas más virulentas o clones hiperepidémicos (OPS/OMS 2016). La detección de los genes *mcr* se ha informado con frecuencia en *S. enterica* en muchos países y para distintos serotipos (entre ellos Typhimurium, Enteritidis, 1,4,[5],12:i:-, London, Heidelberg, Newport, Saintpaul,

Dublin...), incluso ocupando el segundo lugar después de *E. coli* (Lima et al. 2019). No obstante, la información en animales silvestres y ambientes en que estos habitan es limitada. En cinco de seis continentes (excluido Antártida), más de 40 países han reportado variantes *mcr* (del *mcr-1* al *mcr-9*), lo que indica la epidemia del gen *mcr* (Luo et al. 2020).

En Costa Rica, los aislamientos clínicos son mayoritariamente pansusceptibles a los antibióticos de uso clínico humano; sin embargo, circulan cepas multirresistentes y/o con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina. Situación similar sucede en los aislamientos de origen veterinario (Bolaños et al. 2014). Estos datos concuerdan con los hallazgos encontrados en nuestro estudio, donde el 14.6 % de los aislamientos tienen sensibilidad disminuida a ciprofloxacina.

Cabe recalcar que la selección de antibióticos se enfocó en determinar la susceptibilidad antibiótica a infecciones por *Salmonella* spp. en posibles casos de infección en personas contacto directo o indirecto con los animales cuyo punto de origen fueran los sitios de manejo. También al no contar con valores de CMI de referencia para primates se extrapolan los de humano. Utilizando el abordaje de Una Salud para establecer el uso de los antibióticos de manera responsable, medidas de higiene y bioseguridad podrían desacelerar la resistencia antimicrobiana tanto por la presión de selección que ejercen los antibióticos sobre las bacterias, así como por la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles.

8.5 Serotipos identificados

Todos los serotipos identificados se han asociado a cuadros clínicos humanos, causando brotes de enfermedad y contaminando alimentos. El número de infecciones humanas por *Salmonella* vinculadas directa o indirectamente a estas fuentes de vida silvestre y ambientes no está definido.

Salmonella Typhimurium y su variante monofásica I 4,[5],12:i:- se reportan como el tercer y quinto serotipos con mayor cantidad de casos reportados en Estados Unidos (CDC 2018). En Costa Rica, estos representan el primero y segundo lugar de serotipos identificados con una distribución por todo el territorio nacional (Bolaños et al. 2014). Situación similar a Europa (D’Incau et al. 2021). *S* Typhimurium contabiliza 4,581 casos, representando 9.8 % y una incidencia de 1.43 por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos (CDC 2018). En otras regiones como Gales del Sur, Australia y Bélgica se ha reportado como el principal serovar causando enfermedad (Ceysens et al. 2015; Simpson et al. 2018) y generando brotes a nivel mundial desde diferentes matrices incluyendo alimentos, animales de compañía (Xiang et al. 2020; CDC 2021; WHO 2022) y ambientes veterinarios afectando la salud de personas y animales (Cherry et al. 2004). La variante monofásica I 4, [5],12:i:- se encuentra fuertemente asociada a la industria alimentaria y su aumento de casos ha sido significativo en los últimos años en Europa (Soyer et al. 2009; D’Incau et al. 2021). Esta variante monofásica en Estados Unidos es la que ha tenido el mayor incremento en la incidencia de casos (580%) registrando 2.179 casos, para 4.7 % y una incidencia de 0.68 por cada 100.000 habitantes en USA (CDC 2018). Estos serovares cada vez generan

mayor preocupación debido al incremento de aislamientos multirresistentes que comprometen la salud global incrementando la morbilidad y mortalidad (Xiang et al. 2020). En Costa Rica ya se reportan aislamientos con presencia de BLEE (Bolaños et al. 2014), lo cual representa un factor de riesgo para su tratamiento y genera preocupación para la salud pública costarricense. *S. Typhimurium* se ha identificado en colecciones de primates causando diarrea (McClure et al. 1986) y de manera asintomática (Renquist y Withney 2008). También se ha aislado en animales silvestres en cautiverio (Smith et al. 2002; Farias et al. 2015; Molina-López et al. 2015; Milton et al. 2018) así como de los cuidadores de la colección (Milton et al. 2018). En vida libre se han reportado aislamientos en mapaches (Baldi et al. 2019) y tortugas (Work et al. 2019). La variante I 4,[5],12:i:- se encuentra reportada en animales de cautiverio sin causar enfermedad (Smith et al. 2002; Molina-López et al. 2015). Para conocimiento del autor, este serovar no se ha reportado en animales silvestres en Costa Rica.

El serotipo Westhampton ha sido identificado en plantas de cosecha en Bostwana (Motsoela et al. 2002), Corea (Kidie et al. 2013) y Nigeria (Raufu et al. 2015). En bivalvos vivos en un mercado en Francia (Doublet et al. 2009) y en un río en Argentina (Anselmo et al. 1999). En Nigeria, es uno de los serotipos mayormente asociados a salmonelosis en camellos, el cual es una fuente de alimento para las personas en esa región (Raufu et al. 2015). Westhampton es un serotipo que se presenta rara vez (Anselmo et al. 1999; Kidie et al. 2013; Raufu et al. 2015). Sin embargo, en USA se reportan hasta el 2016, 33 casos de salmonelosis humana asociados a este serotipo (CDC 2018). En los reportes de *Salmonella* del INCIENSA de Costa Rica no se ha reportado este serotipo (Bolaños et al. 2014)

S. Westhampton se ha descrito principalmente asociada a ambientes donde hay animales. En nuestro estudio las muestras correspondientes a este serotipo coinciden con lo reportado al encontrarse en ambientes y alimentos, todas pertenecientes al mismo sitio de manejo. En este sitio, las muestras provenientes de monos no pertenecen a este serotipo cual sugiere que el reservorio de *S. Westhampton* puede mantenerse en el ambiente o alguna especie de animal no identificada, o bien haber ingresado y diseminado por alimentos o fómites contaminados al lugar.

Un aislamiento proveniente de las heces de un mono congo resultaron con un patrón STM 2,5 y STY 0. Dicho perfil es compartido por dos serovares: Braenderup y Ohio, los cuales son indistinguibles por este método (Kim et al. 2006). Desde el 2001 hasta el 2016, el serotipo Braenderup ha sido el tercer serotipo con mayor incidencia de casos (aumentando en un 138%) en USA. Para el 2016 se encontró en el puesto 9 de casos confirmados provenientes de humanos con 1001 reportes, representando el 2.1 % y una incidencia de 0.31 por cada 100 000 habitantes (CDC, 2018). En Costa Rica se han presentado dos casos de origen humano en el 2018 en Alajuela (Tijerino Ayala et al. 2020). A nivel mundial existe una amplia descripción de brotes asociados a alimentos como tomates (Gupta et al. 2007), verduras de hojas verdes (Gajraj et al. 2012), mangos (CDC 2012) y melones (ECDC 2021). También existen reportes de aves silvestres en cautiverio de los cuales se aisló este serovar (Smith et al. 2002; Reche et al. 2003; Jijón et al. 2007) así como de vida libre (Allgayer et al. 2009; Grigar et al. 2017). Este serovar ya ha sido aislado de primates (Knöbl et al. 2011). Por otra parte, *S. Ohio* es un serovar raro que causa enterocolitis, puede causar brotes y generalmente se adquiere de los alimentos (Bertrand et al. 2010; Kato et al. 2012). Sin

embargo, sus reservorios y vías de transmisión por medio de alimentos suelen ser desconocidas y difíciles de establecer (Soto et al. 2000; Bertrand et al. 2010). En Costa Rica, este serovar no se ha reportado según el centro de referencia (Tijerino Ayala et al. 2020). En California, S. Ohio se ha reportado en aves silvestres en cautiverio (Smith et al. 2002). El primate del cual este aislamiento fue obtenido compartía espacio con otro primate, el cual también resultó positivo, sin embargo, de este otro aislamiento el serotipo no se pudo identificar, lo que sugiere que estos animales se colonizaron en momentos diferentes.

En cuanto al serotipo Newport, de acuerdo al último reporte se *Salmonella* del CDC, para el 2016 se encontró en el puesto 2 de casos confirmados provenientes de humanos con 4728 reportes, representando el 10.1 % y una incidencia de 1.47 por cada 100 000 habitantes en los Estados Unidos (CDC 2018). Mientras que en Costa Rica ocupa el octavo lugar de aislamientos de acuerdo al INCIENSA (Tijerino Ayala et al. 2020). En los últimos años ha incrementado los aislamientos multirresistentes de S. Newport, lo cual ha generado una preocupación por la diseminación de estas cepas (Zhao et al. 2003; Poppe et al. 2006; Varma et al. 2006). Su aislamiento de alimentos que han causado brote se encuentra evidenciado en múltiples ocasiones asociados a tomates, (Greene et al. 2008), pepinos (Angelo et al. 2015), carnes (Espíe et al. 2005; Poppe et al. 2006), así como ambientes y animales silvestres (Smith et al. 2002; Poppe et al. 2006). Este serovar ya ha sido aislado de primates (Knöbl et al. 2011).

Para el 2016 se encontró S. Anatum en el puesto 20 de casos confirmados provenientes de humanos con 257 reportes, representando el 0.6 % y una incidencia

de 0.08 por cada 100 000 habitantes en los USA (CDC 2018). Asimismo existe evidencia de que *S. Anatum* multirresistente ha provocado casos globales estrechamente relacionados con el inadecuado manejo durante el embalaje, el transporte y la manipulación de los alimentos en la cocina de los consumidores (Feng et al. 2020) así como brotes más concentrados también asociado al deficiente manejo de alimentos (Pakalniskiene et al. 2009). Se ha aislado de alimentos como queso (da Cunha-Neto et al. 2020), ensaladas (Pakalniskiene et al. 2009), vegetales (Quiroz-Santiago et al. 2009; Hassan et al. 2017). Incluso se comporta como agente causal de enfermedad nosocomial (Dargatz y Traub-Dargatz 2004), lo que representaría un riesgo para la conservación y colección si no se tienen las medidas de bioseguridad adecuadas.

De acuerdo con el reporte de *Salmonella* de Costa Rica, se contabiliza un caso de origen desconocido de *S. Anatum* (Tijerino Ayala et al. 2020). Múltiples reportes de *S. Saintpaul* en distintos países distribuidos en diferentes continentes asociados a alimentos se han descrito en matrices como pavo (Beutlich et al. 2010), mariscos (Akiyama et al. 2011) melón (Munnoch et al. 2009), tomate, chiles (CDC 2008; Barton-Behravesh et al. 2011), así como en ríos (Medrano-Félix et al. 2018), ambientes (Akiyama et al. 2011) y animales en cautiverio (Smith et al. 2002). El reporte del CDC, para el 2016 colocó en el puesto 11 de casos confirmados provenientes de humanos con 778 reportes, representando el 1.7% y una incidencia de 0.24 por cada 100 000 habitantes en los Estados Unidos (CDC 2018). Para Costa Rica, se reportan 2 casos, uno con origen de Heredia y otro con origen desconocido (Tijerino Ayala et al. 2020). Los serotipos *Anatum* y *Saintpaul* son indistinguibles de acuerdo a la metodología

utilizada, se necesita un PCR para la proteína STM7 para discriminar entre los serotipos (Kim et al. 2006). Dos primates de esta colección (Cuadro 5) resultaron positivos a los serotipos Newport y Anatum/Saintpaul. El aislamiento de estos serotipos fue único, sugiriendo que los animales adquirieron la bacteria posiblemente en momentos diferentes. Estos animales no compartían recinto.

9. CONTROL DE LOS AGENTES INFECCIOSOS

Ciertos factores pueden asociarse a la dificultad del control de patógenos en primates *ex situ*. El alojamiento, comportamientos y las condiciones de vida en cautiverio de los primates resultan que el control sea muy difícil. La deficiente documentación de registros médicos, la falta de conocimiento del personal acerca de patógenos y su transmisión son clave. Muchas veces no se cuentan con las condiciones para separar los animales en grupos de acuerdo con su condición de salud. El muestreo y procesamiento de las muestras es un trabajo logístico complejo y caro, que limita que muchas condiciones de salud sean diagnosticadas y descritas en una colección (National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal 2003).

Estas características fueron expresadas y observadas en los diferentes sitios de manejo, lo que podría favorecer la prevalencia de *Salmonella* entre animales, ambientes y personas si no se cumplen las medidas de higiene y bioseguridad. Al conversar con los trabajadores, en su mayoría tenían conocimiento sobre enfermedades que se pueden transmitir entre animales y personas, sin embargo, no contemplaban que los primates pueden ser portadores de *Salmonella*.

A partir de un sitio contaminado, si no se identifican, tienen las medidas de higiene y bioseguridad adecuadas puede generarse un brote que afecte toda una nación (Bertrand et al. 2010). La vigilancia e identificación de matrices con la potencialidad de albergar estos microorganismos es clave para la prevención de brotes.

Debido a las limitantes económicas y sobrecarga de animales por parte de algunos centros, el tema de las cuarentenas de ingreso tiende a ser deficientes, principalmente por la falta de exámenes que se pueden realizar en los animales, así como los espacios que necesitan para llevar a cabo una cuarentena adecuada.

Las medidas de bioseguridad e higiene se ha demostrado que son efectivas para disminuir los casos de diarrea (principal síntoma de salmonelosis). Así quedó evidenciado en el país que al establecerse medidas estrictas de higiene y bioseguridad durante la pandemia del COVID-19, en donde los casos bajaron en un 28% del 2019 al 2020 (MINSA 2020) y del 34% del 2020 al 2021 (MINSA 2021).

10. TRATAMIENTO DE LOS PRIMATES

El tratamiento de salmonelosis en primates se enfoca en la antibioticoterapia basada en el perfil de sensibilidad. Es esencial corregir las pérdidas de fluidos, desbalance de electrolitos y ácido base, ya que es la deshidratación severa representa el mayor peligro de muerte. La terapia con antibióticos debe reservarse para animales con diarrea severa o septicemia. El control de los signos clínicos es fundamental. El tratamiento de estos portadores asintomáticos, por el contrario, puede aumentar la probabilidad de desarrollo de un estado de portador e incrementar la resistencia antibacteriana. El potencial zoonótico de *Salmonella* y la dificultad de eliminar el estado de portador pueden requerir la formación de grupos basados en esta característica. Si se llegara a considerar el tratamiento, debe hacerse un análisis de riesgos y beneficios. También se deben evaluar riesgos de contaminación para colección de primates y el personal (Jijón et al. 2007; Abee et al. 2012; Balansard et al. 2019). Fomentar las practicas que reduzcan el estrés e incrementen el enriquecimiento ambiental, adecuada nutrición y cuidados contribuye a controlar la diseminación de este y otros agentes. El control de vectores y fomites son medidas importantes de bioseguridad que apoyadas en las prácticas de higiene favorecen el control de *Salmonella* en sitios de manejo ex situ (Jang et al. 2008; Hoelzer et al. 2011; Silva-Hidalgo et al. 2012a).

11. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Debido a la situación sanitaria de la COVID-19 el estudio contó con diferentes limitaciones asociadas a la misma. En los centros que albergan animales silvestres hubo cierres parciales, despido de personal, menor ingreso de recursos económicos lo que afectó el muestreo en estos sitios. Esto ya que se atrasaron los permisos de investigación, no había personal disponible para recibirnos y debido a sus propias medidas de bioseguridad se retrasó el muestreo.

Los centros que no se encontraban al día con la Caja Costarricense del Seguro Social y Hacienda no se les puede otorgar permisos de acceso genético/bioquímico. Actualmente muchas de las pruebas de salud incluyen técnicas diagnósticas que requieren el acceso genético a los microorganismos. Algunos de ellos expresaron que la pandemia influyó en esto al limitarse los ingresos económicos para realizar estos pagos. De esta forma también se afectó el estudio indirectamente. Inclusive sin pandemia, los permisos de investigación tienen mucha burocracia y aunque los trámites ahora son en línea, esto no siempre agiliza el proceso.

Hubo cierre de instituciones como las gubernamentales que se encargaban de los permisos y una vez que reabrieron se encontraban sobrecargados de trabajo, lo que nos afectó. La universidad también tuvo cierres de las instalaciones y cuando reabrieron hubo tiempo de trabajo limitado generando extensión del tiempo estimado de finalización. Tanto por parte de la Universidad como de los suplidores de materiales y reactivos hubo retrasos para adquirir los insumos necesarios para llevar a cabo el proyecto, inclusive en ocasiones se tuvo que detener el proyecto por esto.

No existen puntos de comparación o referencia para evaluar las CMI de los aislamientos de *Salmonella* en primates, por lo tanto, si uno de estos individuos se llegara enfermar, se tendría que extrapolar estos valores de otras especies.

La metodología de PCR fue una limitante para identificar los serotipos de los aislamientos obtenidos. Técnicas más especializadas como la Secuenciación de Genoma Completo es necesaria para identificar estos serotipos que el PCR no incluye.

Se realizó un muestreo observacional transversal, por lo que podría darse una subestimación de la prevalencia si en ese momento el(los) animal(s) no excreta(n) el microorganismo. El estudio no pretendió determinar causas de colonización, sino estimar la prevalencia de *Salmonella* desde diferentes matrices y su caracterización de resistencia y serotipo.

Ciertos aspectos de salud son difíciles de determinar y analizar debido a que muchos de estos animales carecen de un expediente de salud que le de trazabilidad a sus eventos de salud como tratamientos o enfermedades.

Cuando se muestrean poblaciones aparentemente saludables, suele haber falsos negativos debido a la excreción intermitente y la baja carga de excreción. El efecto de estos dos factores previamente descritos se puede contrarrestar al usar heces (tal como se hizo) en el cultivo en lugar de hisopados rectales. Otro aspecto importante que podría reducir esos falsos negativos es el muestreo seriado (al menos tres días) (Balansard et al. 2019). No obstante, debido a la logística discutida con los sitios de manejo y experiencias previas en la colecta de muestras no invasivas, esto no se habría logrado realizar con todos los primates.

12. RELEVANCIA DE LA SALUD PÚBLICA

Los primates pueden excretar de manera asintomática agentes infecciosos entre ellos *Salmonella*. El contacto directo o indirecto con estos individuos puede desencadenar eventos de enfermedad tanto en personas como otros animales. Se debe evitar el contacto directo con estos animales y de ser así utilizando todas las medidas de bioseguridad establecidas. También el contacto con reservorios como fómites o ambientes puede causar infecciones, por lo tanto, las medidas de higiene personal son clave para evitar casos clínicos. Los alimentos brindados a los animales deben manipularse con el cuidado adecuado para evitar que estos se enfermen o se colonicen con la bacteria. *Salmonellas* que incluyen serotipos frecuentemente asociados a cuadros clínicos y brotes pueden estar presentes en estas matrices y ser no susceptibles a las opciones de tratamiento establecidas generando morbilidad y mortalidad importante. Estas matrices (animales silvestres, ambientes y alimentos) deben considerarse de importancia a la hora de hacer vigilancia epidemiológica de *Salmonella*.

13. CONCLUSIONES

1. Se logró aislar *Salmonella* de las tres matrices de estudio (heces-ambientes-alimentos) y se obtuvo una prevalencia mayor a lo esperado al inicio del estudio. La transmisión de patógenos entre humanos y primates no humanos es posiblemente uno de los resultados más peligrosos de las interacciones entre humanos y vida silvestre. Basados en los resultados de este estudio, podemos concluir que los primates no humanos en Costa Rica mantenidos en cautiverio pueden excretar *Salmonella* de manera asintomática. La presencia de *Salmonella* en superficies anexas a estos primates es un hallazgo de importancia para la salud pública, principalmente para las personas en contacto con estos primates debido a sus deberes laborales.

2. La frecuencia de resistencia es baja entre los aislamientos obtenidos. Esta es dada por ciprofloxacina y nitrofurantoina. No se lograron identificar aislamientos multirresistentes. La vigilancia epidemiológica de patrones de resistencia antimicrobiana en animales silvestres y ambientes, así como los patrones de transmisión, puede favorecer a la creación de estrategias de prevención y diseminación de esta.

3. Se logró identificar el serotipo de pocos aislamientos, sin embargo, los que se identificaron han sido asociados con casos clínicos en personas y algunos en primates, representando un riesgo a la salud pública y conservación de especies. Dada la baja prevalencia y variedad de serotipos aislados, es probable que la principal fuente de

transmisión hacia estos animales es por el consumo de agua o alimentos contaminados y superficies que tienen contacto con roedores, aves, insectos u otros reservorios del microorganismo. El control de *Salmonella* en estos lugares representa un desafío por la variedad de individuos, no solo primates, que pueden actuar como portadores asintomáticos. La inocuidad de los alimentos, constante limpieza, desinfección y aplicación de medidas de bioseguridad es esencial para el control de *Salmonella* en este tipo de poblaciones y evitar casos clínicos.

14. RECOMENDACIONES

Al Gobierno de Costa Rica e Instituciones públicas. Dado que los primates son especies emblemáticas para Costa Rica, así como uno de los principales atractivos turísticos, se debe considerar la inversión y preocupación de la salud de estas poblaciones tanto en condiciones *ex situ* como *in situ* (en su hábitat natural) (Webb y McCoy 2014). El monitoreo de enfermedades infecciosas y no infecciosas es relevante, ya que actualmente estas especies se encuentran amenazadas y en peligro de extinción. La educación constante hacia la ciudadanía costarricense y turistas acerca de la importancia del cuidado y respeto a estos animales, a las enfermedades infecciosas y a los ecosistemas debe ser un tema educativo que se promueva abordaje integral transdisciplinario que recalque la importancia de este valor para disminuir los riesgos de transmisión de enfermedades. En especial de las personas que trabajan con estos animales y turistas son poblaciones críticas por el grado de exposición debido a su labor en el caso de los cuidadores y por negligencia en el caso de algunos turistas.

A los Centros que mantiene primates en cautiverio. Las personas que trabajan con estos animales deben capacitarse acerca de los riesgos laborales y enfermedades infecciosas. Cuando laboren con ellos deben encontrarse libres de enfermedades y mantenerse con monitorios de salud constante. Se recomienda que, al incluirse un primate en una colección, se realice previamente una evaluación de salud completa a cargo de un médico veterinario que incluya test de tuberculosis negativo, examen parasitológico, examen bacteriológico para *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Yersinia*. Dependiendo de las circunstancias se pueden realizar exámenes virales,

radiografías para evaluar la densidad ósea y pulmones en casos de tuberculosis y neumonía. La evaluación de enteropatógenos bacterianos en primates idealmente debería realizarse al momento de ingresar, después de cumplir el periodo de cuarentena y anualmente (Miller y Fowler 2015; Perpiñán et al. 2017). En teoría se recomienda la separación o retiro de los portadores de *Salmonella*, pero en la práctica no siempre es factible. Debido a esto, la clave es la limpieza, desinfección y bioseguridad en el lugar acompañados de un bajo impacto por estrés (Ketz-Riley 1986; de Carvalho 2014). Se deben recoger las heces constantemente y se puede utilizar hipoclorito de sodio para la desinfección (de Carvalho 2014) o Virkon (Dunowska et al. 2005; Møretørø et al. 2009). Se recomienda el entrenamiento en las buenas prácticas de manipulación de alimentos para las personas que se encargan de la alimentación de los primates, la limpieza constante de herramientas y utensilios que puedan servir como fomite para evitar que este sea un medio de diseminación de *Salmonella*. El control de roedores y aves dentro de los recintos, así como en los espacios donde se preparan alimentos ayuda a controlar patógenos también. En cuanto a manejo se recomienda mantener densidad de animales adecuada, un balance de grupos sociales, periodos de introducción y adaptación prolongados, enriquecimiento ambiental y nutrición balanceada (Ketz-Riley 1986).

A las Universidades e Investigadores. Se recomienda a futuro un estudio longitudinal que evalúe diferencias de condiciones climáticas y factores de riesgo tanto para los animales como para las personas en contacto con ellos, así como la evaluación de *Salmonella* en heces en los trabajadores de los sitios de manejo con

contacto regular con los animales silvestres. Existe evidencia de que trabajadores de estos sitios pueden ser portadores asintomáticos (Milton et al. 2018). También la evaluación longitudinal de especies de vida libre, sobre todo aquellas que viven en ambientes con alto riesgo de contacto con turistas o pobladores, así como donde el manejo de aguas y desechos es deficiente. Se recomienda también hacer vigilancia de resistencia antimicrobiana en otras bacterias que sirvan como centinela, ejemplo, *E. coli*. Vigilancia e investigación epidemiológica de microorganismos portadores de resistencia tanto en animales, ambientes y los alimentos debe fomentarse.

A las autoridades competentes y ciudadanía. Para nadie es un secreto que muchos turistas buscan realizar visitas en estos sitios con la finalidad de tener una experiencia y contacto con animales silvestres. Esta práctica debería ser vetada de estos lugares debido al riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, así como los accidentes físicos. No se recomienda el contacto directo con los primates, ni la alimentación de animales silvestres por parte de particulares, en especial de niños ni personas inmunocomprometidas por el riesgo de sufrir una zoonosis. También por el riesgo que los animales sufran una antropozoonosis. Asimismo, se deben de mejorar las barreras de restricción entre particulares y los animales ya que muchas veces son muy estrechas y aunque no haya contacto directo se puede dar transmisión por aerosoles de agentes infecciosos.

Muchas de estas recomendaciones requieren un esfuerzo económico, de materiales y recurso humano que no son sencillos de conseguir. Pero se pueden plantear metas y buscar apoyo que permitan poco a poco mejorar las interacciones entre humanos y primates de acuerdo con las necesidades de cada sitio.

15. FINANCIAMIENTO

La tesis se encuentra adscrita al “Proyecto: 0123-19, Prevalencia, caracterización genómica y resistencia antimicrobiana de *Salmonella enterica* recuperada de primates no humanos de nuevo mundo, alimentos y ambiente en centros de cautiverio de Costa Rica”, a cargo de la Dra. Lohendy Muñoz Vargas. Los materiales utilizados en este proyecto fueron donados por el Departamento de Medicina Preventiva y Comparativa de la Universidad Estatal de Ohio, Estados Unidos. Se contó con el acceso a las instalaciones, equipo y materiales del Laboratorio de Bacteriología y del Laboratorio de Inmunología/Bioquímica de la EMV, UNA, para el procesamiento de muestras y análisis respectivo. El Hospital de Especies Menores y Silvestres, EMV, UNA, colaboró con materiales de laboratorio y logística para el proceso de toma y procesamiento de muestras por medio del proyecto Diagnóstico, Control de Enfermedad y Manejo de Animales Silvestres. La serotipificación de los aislamientos se llevó a cabo en el INCIENSA. Se obtuvo ayuda económica por parte del Fondo Concursable para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles (FOCAES) de la Universidad Nacional para el transporte y alimentación del investigador.

16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abee CR, Mansfield K, Tardif SD, Morris T. 2012. Nonhuman Primates in Biomedical Research: Diseases. Academic Press. San Diego, CA, USA. 852p

Agarwal KC, Chakravarti RN. 1969. Preliminary observations on the intestinal bacterial flora of wild rhesus monkeys with special reference to shigellosis, salmonellosis and vibriosis. *Journal of the Association of Physicians of India*. 17(7):409–12.

Akiyama T, Khan AA, Cheng C-M, Stefanova R. 2011. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul isolated from imported seafood, pepper, environmental and clinical samples. *Food Microbiology*. 28(6):1124–1128.

Ali S, Muzsly M, Wilson P. 2015. A Novel Quantitative Sampling Technique for Detection and Monitoring of *Clostridium difficile* Contamination in the Clinical Environment. *J Clin Microbiol*. 53(8):2570–2574.

Allgayer MC, Oliveira SJ de, Mottin VD, Loiko MR, Abilleira F, Guedes NMR, Passos DT, Weimer T de A. 2009. Isolamento de *Salmonella* Braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Cienc Rural*. 39(8):2542–2545.

Almeida C, Cerqueira L, Azevedo NF, Vieira MJ. 2013. Detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and

standard culture methods in different types of food samples. *Int J Food Microbiol.* 161(1):16–22.

Angelo KM, Chu A, Anand M, Nguyen T-A, Bottichio L, Wise M, Williams I, Seelman S, Bell R, Fatica M, et al. 2015. Outbreak of *Salmonella* Newport Infections Linked to Cucumbers — United States, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 64(6):144–147.

Anselmo RJ, Viora S, Barrios H, Terragno R, Alcaín A, Caffer MI. 1999. Serotypes of *Salmonella* isolated from the Luján River, Argentina. *Rev Latinoam Microbiol.* 41(2):77–82.

Bakkeren E, Huisman J, Fattinger S, Hausmann A, Furter M, Egli A, Slack E, et al. 2019. *Salmonella* Persists Promote the Spread of Antibiotic Resistance Plasmids in the Gut. *Nature*.

Balansard I, Cleverley L, Cutler KL, Spångberg MG, Thibault-Duprey K, Langermans JA. 2019. Revised recommendations for health monitoring of non-human primate colonies (2018): FELASA Working Group Report. *Lab Anim.* 53(5):429–446.

Baldi M, Barquero Calvo E, Hutter SE, 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.

Barton Behravesh C, Mody RK, Jungk J, Gaul L, Redd JT, Chen S, Cosgrove S, Hedican E, Sweat D, Chávez-Hauser L, et al. 2011. 2008 Outbreak of Salmonella Saintpaul Infections Associated with Raw Produce. *New England Journal of Medicine*. 364(10):918–927.

Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, McFarland MA, Brown EW. 2016. Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. *Microb Biotechnol*. 9(3):279–292.

Bertrand S, Dierick K, Heylen K, de Baere T, Pochet B, Robesyn E, Lokietek S, Van Meervenne E, Imberechts H, Zutter L, et al. 2010. Lessons Learned from the Management of a National Outbreak of Salmonella Ohio Linked to Pork Meat Processing and Distribution. *Journal of food protection*. 73:529–34.

Beutlich J, Rodríguez I, Schroeter A, Käsbohrer A, Helmuth R, Guerra B. 2010. A Predominant Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serovar Saintpaul Clonal Line in German Turkey and Related Food Products. *Appl Environ Microbiol*. 76(11):3657–3667.

Bintsis T. 2018. Microbial pollution and food safety. *AIMS Microbiol*. 4(3):377–396.

de Blas I, [Internet]. 2006. Working in Epidemiology. [citado 26 de Diciembre del 2019].

Disponibile en : <http://www.winepi.net>

Bolaños H, Acuña M, Tijerino A, Jiménez A, Duarte F, Sánchez L, Dittel I, Vargas J, Campos E. Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología. [Internet]. 2014. Informe de vigilancia basada en laboratorio: Vigilancia basada en laboratorio de *Salmonella*, Costa Rica, 2013 [citado 2 de Agosto del 2018]. Disponible en: http://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2014/Bacterias/Vigilancia%20basada%20en%20laboratorio%20de%20Salmonella,%20Costa%20Rica,%202013.pdf.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. Salmonella Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(7):2465–2467.

Calderón LGR, Ortegón LH, Cely GEE, Granja YT, Nuñez JM. 2013. Aislamiento, identificación y patrón de sensibilidad antimicrobiana de salmonella spp. en primates en cautiverio. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 5(1):131–144.

Cardona-Castro N, Restrepo-Pineda E, Correa-Ochoa M. 2002. Detection of hilA gene sequences in serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97:1153–1156.

de Carvalho V. 2014. Colibacilose e salmonelose. In: *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. 2da ed. Editora ROCA SA. p. 1389–1398. Sao Paulo, Brasil.

Cattoir V, Weill F-X, Poirel L, Fabre L, Soussy C-J, Nordmann P. 2007. Prevalence of qnr genes in Salmonella in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59(4):751–754.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Outbreak of Salmonella serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items--United States, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 57(34):929–934.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. [Internet] 2012. CDC - Salmonella Braenderup Infections Associated with Mangoes - Salmonella. 2019. [citado el 5 de Octubre del 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/braenderup-08-12/index.html>.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2016. Laboratory Standard Operating Procedure for PulseNet NexTera XT Library Prep and Run Setup for the Illumina MiSeq. :46.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2018. National Salmonella Surveillance Annual Report, 2016. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC. :87.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. [Internet] 2021. Reports of Salmonella Outbreak Investigations from 2020 | Salmonella | CDC. [citado el 18 de

Mayo del 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-2020.html>.

Ceyssens P-J, Mattheus W, Vanhoof R, Bertrand S. 2015. Trends in Serotype Distribution and Antimicrobial Susceptibility in *Salmonella enterica* Isolates from Humans in Belgium, 2009 to 2013. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59(1):544–552.

Cherry B, Burns A, Johnson GS, Pfeiffer H, Dumas N, Barrett D, McDonough PL, Eidson M. 2004. *Salmonella* Typhimurium Outbreak Associated with Veterinary Clinic. *Emerg Infect Dis*. 10(12):2249–2251.

Chomel BB, Belotto A, Meslin F-X. 2007. Wildlife, Exotic Pets, and Emerging Zoonoses. *Emerg Infect Dis*. 13(1):6–11. doi:10.3201/eid1301.060480.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. [Internet] 2022. CLSI M100-ED32 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. [citado el 22 de Julio del 2022]. Disponible en: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&scope=user>

da Cunha-Neto A, Carvalho LA, Castro VS, Barcelos FG, Carvalho RCT, Rodrigues D dos P, Conte-Junior CA, Figueiredo EE de S. 2020. *Salmonella* Anatum, *S. Infantis* and *S. Schwarzengrund* in Brazilian Cheeses: Occurrence and antibiotic resistance profiles.

International Journal of Dairy Technology. 73(1):296–300.

Cuypers WL, Jacobs J, Wong V, Klemm EJ, Deborggraeve S, Van Puyvelde S. 2018. Fluoroquinolone resistance in Salmonella: insights by whole-genome sequencing. *Microb Genom.* 4(7):e000195.

Dargatz DA, Traub-Dargatz JL. 2004. Multidrug-resistant Salmonella and nosocomial infections. *Veterinary Clinics: Equine Practice.* 20(3):587–600.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop.* 78(2):103–116.

D’Incau M, Salogni C, Giovannini S, Ruggeri J, Scali F, Tonni M, Formenti N, Guarneri F, Pasquali P, Alborali GL. 2021. Occurrence of Salmonella Typhimurium and its monophasic variant (4, [5],12:i:-) in healthy and clinically ill pigs in northern Italy. *Porcine Health Management.* 7(1):34.

Dolejska M, Literak I. 2019. Wildlife Is Overlooked in the Epidemiology of Medically Important Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 63(8):e01167-19, /aac/63/8/AAC.01167-19.atom.

Doublet B, Granier SA, Robin F, Bonnet R, Fabre L, Brisabois A, Cloeckaert A, Weill F-X. 2009. Novel plasmid-encoded ceftazidime-hydrolyzing CTX-M-53 extended-

spectrum beta-lactamase from *Salmonella enterica* serotypes Westhampton and Senftenberg. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(5):1944–1951.

Dunn, J. C. & Cristóbal-Azkarate, J. (2016) New World monkeys. *Nature Education Knowledge* 7(6):1

Dunowska M, Morley PS, Hyatt DR. 2005. The effect of Virkon S fogging on survival of *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* on surfaces in a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol.* 105(3–4):281–289.

Ehuwa O, Jaiswal AK, Jaiswal S. 2021. *Salmonella*, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods.* 10(5):907.

Erdozain G, KuKanich K, Chapman B, Powell D. 2013. Observation of Public Health Risk Behaviours, Risk Communication and Hand Hygiene at Kansas and Missouri Petting Zoos – 2010–2011. *Zoonoses and Public Health.* 60(4):304–310.

Espié E, De Valk H, Vaillant V, Quelquejeu N, Le Querrec F, Weill FX. 2005. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections linked to the consumption of imported horse meat in France. *Epidemiol Infect.* 133(2):373–376.

[ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control. [ECDC]. 2021. Rapid

Outbreak Assessment: Multi-country outbreak of *Salmonella* Braenderup ST22, presumed to be linked to imported melons. European Centre for Disease Prevention and Control. [Citado el 3 de Marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-outbreak-assessment-multi-country-outbreak-salmonella-braenderup-st22>.

Fang FC. 2015. Fluoroquinolone Resistance in *Salmonella* and the Utility of Perfloracin Disk Diffusion. *J Clin Microbiol.* 53(11):3401–3404.

Farias LFP, Oliveira CJB, Medardus JJ, Molla BZ, Wolfe BA, Gebreyes WA. 2015. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Salmonella enterica* in Captive Wildlife and Exotic Animal Species in Ohio, USA. *Zoonoses and Public Health.* 62(6):438–444.

Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. 2012. Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet.* 379(9835):2489–2499.

Feng Y, Chang Y-J, Pan S-C, Su L-H, Li H-C, Yang H-P, Yu M-J, Chiu C-H. [Internet] Characterization and Source Investigation of Multidrug-Resistant *Salmonella* Anatum from a Sustained Outbreak, Taiwan - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. [Citado el 7 Mar 2022]. Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/12/20-0147_article.

Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. 2017. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 57(13):2857–2876.

Friedman CR, Torigian C, Shillam PJ, Hoffman RE, Heltzel D, Beebe JL, Malcolm G, DeWitt WE, Hutwagner L, Griffin PM. 1998. An outbreak of salmonellosis among children attending a reptile exhibit at a zoo. *J Pediatr*. 132(5):802–807.

Fuentes, A. 2012. Ethnoprimateology and the anthropology of the human-primate interface. *Annual Review of Anthropology*, 41, 101–117.

Fuentes, A. 2016. *Detección molecular de especies de Plasmodium y bacterias del complejo Mycobacterium tuberculosis en primates no humanos en cautiverio de Costa Rica* (Tesis de maestría). Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Gajraj R, Pooransingh S, Hawker JI, Olowokure B. 2012. Multiple outbreaks of *Salmonella braenderup* associated with consumption of iceberg lettuce. *International Journal of Environmental Health Research*. 22(2):150–155.

García F. 2001. Resistencia bacteriana a antibióticos. *Acta Médica Costarricense*. 43(3):101–102.

García V, Montero I, Bances M, Rodicio R, Rodicio MR. 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. *Microb Drug Resist.* 23(4):405–412.

Gandra S, Barter DM, Laxminarayan R. 2014. Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clin Microbiol Infect.* 20(10):973–980.

Gebreyes WA, Dupouy-Camet J, Newport MJ, Oliveira CJB, Schlesinger LS, Saif YM, Kariuki S, Saif LJ, Saville W, Wittum T, et al. 2014. The Global One Health Paradigm: Challenges and Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and Environment Interface in Low-Resource Settings. *PLoS Negl Trop Dis.* [Internet] [citado el 13 Octubre del 2019]; 8(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4230840/>.
doi:10.1371/journal.pntd.0003257

Good RC, May BD, Kawatomari T. 1969. Enteric pathogens in monkeys. *J Bacteriol.* 97(3):1048–1055.

Gopee NV, Adesiyun AA, Caesar K. 2000. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *J Wildl Dis.* 36(2):284–293.

Gordon MA. 2011. Invasive Non-typhoidal *Salmonella* Disease – epidemiology, pathogenesis and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 24(5):484–489.

Greene SK, Daly ER, Talbot EA, Demma LJ, Holzbauer S, Patel NJ, Hill TA, Walderhaug MO, Hoekstra RM, Lynch MF, et al. 2008. Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005. *Epidemiology & Infection*. 136(2):157–165.

Grigar MK, Cummings KJ, Rankin SC. 2017. Prevalence of *Salmonella* among waterfowl along the Texas Gulf coast. *Zoonoses and Public Health*.

Guay DR. 2001. An update on the role of nitrofurans in the management of urinary tract infections. *Drugs*. 61(3):353–364.

Guenther S, Ewers C, Wieler LH. 2011. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Front Microbiol*. 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00246.

Gunn JS, Marshall JM, Baker S, Dongol S, Charles RC, Ryan ET. 2014. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence. *Trends Microbiol*. 22(11):648–655. doi:10.1016/j.tim.2014.06.007

Gupta SK, Nalluswami K, Snider C, Perch M, Balasegaram M, Burmeister D, Lockett J, Sandt C, Hoekstra RM, Montgomery S. 2007. Outbreak of *Salmonella* Braenderup infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, 2004: a useful method for subtyping exposures in field investigations. *Epidemiology & Infection*.

135(7):1165–1173.

Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. 2008. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4 ed. John Wiley & Sons. Iowa, USA. 651p

Hammerl JA, Borowiak M, Schmoger S, Shamoun D, Grobbel M, Malorny B, Tenhagen B-A, Käsbohrer A. 2018. mcr-5 and a novel mcr-5.2 variant in *Escherichia coli* isolates from food and food-producing animals, Germany, 2010 to 2017. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73(5):1433–1435.

Hassan R, Rounds J, Sorenson A, Leos G, Concepción-Acevedo J, Griswold T, Tesfai A, Blessington T, Hardy C, Basler C. 2017. Multistate Outbreak of *Salmonella* Anatum Infections Linked to Imported Hot Peppers — United States, May–July 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 66(25):663–667.

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. von Seidlein L, editor. *PLoS Med*. 12(12):e1001923..

Hernandez-Rojas R. 2022. Determinación de los perfiles de susceptibilidad a antibióticos y genes *bla*CMY-2 y *bla*CTX-M en bacterias del género *Salmonella*

aisladas de tres matrices de la cadena de producción avícola de Costa Rica. Heredia, C.R.: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.

Hoelzer K, Moreno Switt AI, Wiedmann M. 2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res.* 42(1):34.

Hohmann EL. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 32(2):263–269.

Huertas-Sánchez G. 2020. Análisis descriptivo de la prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Salmonella enterica* no tifodeo durante el período postparto de vacas lecheras en la Región Central y Norte de Costa Rica. Heredia, C.R.: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.

Ismael-Acle Esquivel F. 2020. Prevalencia de *Salmonella enterica* no tifoidal en heces y tejidos linfáticos de terneros para consumo humano en dos plantas de cosecha en Costa Rica. Heredia, C.R.: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill F-X. 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 165(7):526–530. doi:10.1016/j.resmic.2014.07.004.

[IUCN] The International Union for Conservation and Nature Red List of Threatened Species. 2019 Aug 13. IUCN Red List of Threatened Species. [Citado el 12 de Agosto del 2019]. <https://www.iucnredlist.org/en>.

Jang YH, Lee SJ, Lim JG, Lee HS, Kim TJ, Park JH, Chung BH, Choe NH. 2008. The rate of *Salmonella* spp. infection in zoo animals at Seoul Grand Park, Korea. *J Vet Sci*. 9(2):177–181.

Javed H, Saleem S, Zafar A, Ghafoor A, Shahzad AB, Ejaz H, Junaid K, Jahan S. 2020. Emergence of plasmid-mediated mcr genes from Gram-negative bacteria at the human-animal interface. *Gut Pathog*. 12(1):54.

Jean-Gilles Beaubrun J, Cheng C-M, Chen K-S, Ewing L, Wang H, Agpaoa MC, Huang M-CJ, Dickey E, Du JM, Williams-Hill DM, et al. 2012. The evaluation of a PCR-based method for identification of *Salmonella enterica* serotypes from environmental samples and various food matrices. *Food Microbiol*. 31(2):199–209.

Jijón S, Wetzel A, LeJeune J. 2007. *Salmonella enterica* isolated from wildlife at two Ohio rehabilitation centers. *J Zoo Wildl Med*. 38(3):409–413. doi:10.1638/1042-7260(2007)38[409:SEIFWA]2.0.CO;2.

Jiménez-Madrigal L. 2022. Prevalencia y determinación de los perfiles de resistencia a antibióticos de *Salmonella enterica* no tifoidea en la cadena de producción de cerdos

para consumo humano de Costa Rica. Heredia, C.R.: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional.

Jiménez-Soto M, Blanco-Peña K, Hagnauer-Barrantes I, Vega-Benavides K. 2013. Centros de acopio de animales silvestres y su relación con la salud pública [Internet]. [citado el 16 de Septiembre del 2019]. Disponible en: <http://www.ambientico.una.ac.cr/pdfs/ambientico/239.pdf>.

Karp BE, Tate H, Plumblee JR, Dessai U, Whichard JM, Thacker EL, Hale KR, Wilson W, Friedman CR, Griffin PM, et al. 2017. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Two Decades of Advancing Public Health Through Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. *Foodborne Pathog Dis.* 14(10):545–557.

Kato H, Ueda A, Tsukiji J, Sano K, Yamada M, Ishigatsubo Y. 2012. Salmonella enterica serovar Ohio septic arthritis and bone abscess in an immunocompetent patient: a case report. *J Med Case Rep.* 6:204.

Ketz-Riley C. 1986. Salmonellosis and Shigellosis. In: *Zoo & Wild Animal Medicine*. 5th ed. Philadelphia: Saunders. USA

Kidie DH, Bae DH, Lee YJ. 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from poultry slaughterhouses in Korea. *Jpn J Vet Res.* 61(4):129–136.

Kim S, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Gautom R, Boyle DS. 2006. Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *J Clin Microbiol.* 44(10):3608–3615.

Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, Döpfer D, Fazil A, Fischer-Walker CL, Hald T, et al. 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLOS Medicine.* 12(12):e1001921.

Knöbl T, Rocha LT, Menão MC, Igayara CAS, Paixão R, Moreno AM. 2011. *Salmonella* Yoruba infection in white-tufted-ear marmoset (*Callithrix jacchus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 31(8):707–710.

Kourany M, Rossan RN. 1971. A subcutaneous abscess associated with *Salmonella typhimurium* in a black howler monkey (*Alouatta villosa*). *Lab Anim Sci.* 21(3):412–414.

Kruse H, Kirkemo A-M, Handeland K. 2004. Wildlife as Source of Zoonotic Infections. *Emerg Infect Dis.* 10(12):2067–2072.

Lahiri A, Lahiri A, Iyer N, Das P, Chakravorty D. 2010. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes Infect.* 12(11):809–818. doi:10.1016/j.micinf.2010.05.010.

Lentz SAM, Dalmolin TV, Barth AL, Martins AF. 2021. *mcr-1* Gene in Latin America:

How Is It Disseminated Among Humans, Animals, and the Environment? *Frontiers in Public Health*. 9:222.

Lenzi A, Marvasi M, Baldi A. 2020. Agronomic practices to limit pre- and post-harvest contamination and proliferation of human pathogenic Enterobacteriaceae in vegetable produce. *Food Control*. 119:107486.

Lessa S, Paes R, Santoro P, Mauro R, Vieira-da-Motta O. 2011. Identification and antimicrobial resistance of microflora colonizing feral pig (*Sus scrofa*) of Brazilian Pantanal. *Braz J Microbiol*. 42(2):740–749.

Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos A-P, Mevius D, Peixe L, Poirel L, Schuepbach-Regula G, Torneke K, et al. 2013. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 56(7):1030–1037.

Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. 2019. Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*. 7(2):55.

Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, et al. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1

in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16(2):161–168.

Luo Q, Wang Y, Xiao Y. 2020. Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (*mcr*) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosafety and Health.* 2(2):71–78.

MacKenzie KD, Palmer MB, Köster WL, White AP 2017. Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic *Salmonella* Strains to Colonize Multiple Host Species. *Frontiers in Veterinary Science.* [Internet]. [Citado el 26 Abril del 2022]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2017.00138>.

Madec J-Y, Haenni M, Nordmann P, Poirel L. 2017. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? *Clin Microbiol Infect.* 23(11):826–833.

Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection.* 18(3):268–281.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM, International Collaboration on Enteric Disease "Burden of Illness" Studies. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 50(6):882–889.

Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013. Clinical Veterinary Microbiology. 2 ed. Elsevier Health Sciences. UK. 901p

McClure HM, Brodie AR, Anderson DC, Brent Swenson R. 1986. Bacterial Infections of Nonhuman Primates. In: Benirschke K, editor. Primates. New York, NY: Springer. (Proceedings in Life Sciences). 531–556. p.

McKinney T. 2014. Species-Specific Responses to Tourist Interactions by White-Faced Capuchins (*Cebus imitator*) and Mantled Howlers (*Alouatta palliata*) in a Costa Rican Wildlife Refuge. Int J Primatol. 35(2):573–589.

Medrano-Félix JA, Castro-del Campo N, Peraza Garay F de J, Martínez-Rodríguez CI, Chaidez C. 2018. Carbon source utilization-based metabolic activity of *Salmonella* Oranienburg and *Salmonella* Saintpaul in river water. Water and Environment Journal. 32(1):118–124.

Miller E, Fowler M. 2015. Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Volume 8. Elsevier Health Sciences. EEUU.

Milton AAP, Agarwal RK, Priya GB, Athira CK, Saminathan M, Reddy A, Aravind M, Kumar A. 2018. Occurrence, antimicrobial susceptibility patterns and genotypic relatedness of *Salmonella* spp. isolates from captive wildlife, their caretakers, feed and water in India. *Epidemiology & Infection*. 146(12):1543–1549.

[MINAE] Ministerio de Ambiente y Energía de Costa Rica). [Internet]. 2019. Carne y productos de origen silvestre se incautan durante operativo en Boca San Carlos y Boca Tapada. [citado el 9 Sep 2019]. Disponible en: [https://www.facebook.com/minaecr/posts/2377689715650937?__xts__\[0\]=68.ARApURPn87bTB2W2X0AU2eV0p5wgBOVq2ZxrWYOfdI78JUFmKTYQUVly43G6pJxjrWkMA-_K3mK-av5U2QSgSoql6eX2WLNOSpd5mcFB_pj1HK8O8Q7PzUUW3i4JtOuscL8KaaCm3SYSWn9dsKcXPhRDI2wmlZZs8iomAi6Dp04zdBjYDYDVQc-YzhsnxXATuV1flXTvgIYEp9MLJquAbnJiwjwcCc3g4E-RGOH69-PudHmyoBQ95aNY3c1Qsy4_phgAbGhniPxyD8LP6_fTwbT5ES7atgaP1VHJBGkBMmC2YXZriKL7X9ycAs0CDXK3Gqcys6ygMsnazKGXKUIVTpSA&__tn__=-R](https://www.facebook.com/minaecr/posts/2377689715650937?__xts__[0]=68.ARApURPn87bTB2W2X0AU2eV0p5wgBOVq2ZxrWYOfdI78JUFmKTYQUVly43G6pJxjrWkMA-_K3mK-av5U2QSgSoql6eX2WLNOSpd5mcFB_pj1HK8O8Q7PzUUW3i4JtOuscL8KaaCm3SYSWn9dsKcXPhRDI2wmlZZs8iomAi6Dp04zdBjYDYDVQc-YzhsnxXATuV1flXTvgIYEp9MLJquAbnJiwjwcCc3g4E-RGOH69-PudHmyoBQ95aNY3c1Qsy4_phgAbGhniPxyD8LP6_fTwbT5ES7atgaP1VHJBGkBMmC2YXZriKL7X9ycAs0CDXK3Gqcys6ygMsnazKGXKUIVTpSA&__tn__=-R)

Minitab 17 Statistical Software. 2010. [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (Citado el 30 de Enero del 2022) Disponible en: www.minitab.com

[MINSAs] Ministerio de Salud República de Costa Rica. [Internet]. 2015. Boletín Estadístico de Enfermedades de Declaración Obligatoria en Costa Rica del año 2015.

[citado el 2 Agosto del 2018]. Disponible en:
<https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/estadisticas-y-bases-de-datos/notificacion-individual/3167-boletin-de-morbilidad-enfermedades-de-declaracion-obligatoria-2015-2/file>

[MINSa] Ministerio de Salud República de Costa Rica. [Internet]. 2021. Registro: Consulta de Productos Registrados en Plataforma (Nitrofurantoina). [citado el 2 Junio del 2021]. Disponible en:
https://registrelo.go.cr/cfm/ms/consultasPublicas/productos_Registrados/reporte.cfm

[MINSa] Ministerio de Salud República de Costa Rica. [Internet]. 2021. Diarreas continúan a la baja Casos bajaron un 34% en comparación con 2020. Ministerio de Salud Costa Rica. [citado el 11 de Agosto 2022]. Disponible en:
<https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa/43-noticias-2021/1033-diarreas-continuan-a-la-baja-casos-bajaron-un-34-en-comparacion-con-2020>.

[MINSa] Ministerio de Salud República de Costa Rica. [Internet]. 2020. Medidas de higiene contra el COVID-19 pudieron provocar baja en diarreas Casos bajaron un 28% en comparación con 2019. Ministerio de Salud Costa Rica. [citado el 11 de Agosto del 2022]. Disponible en: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/prensa/42-noticias-2020/478-medidas-de-higiene-contra-el-covid-19-pudieron-provocar-baja-en-diarreas-casos-bajaron-un-28-en-comparacion-con-2019>.

Molina A, Granados-Chinchilla F, Jiménez M, Acuña-Calvo MT, Alfaro M, Chavarría G. 2016. Vigilance for Salmonella in Feedstuffs Available in Costa Rica: Prevalence, Serotyping and Tetracycline Resistance of Isolates Obtained from 2009 to 2014. *Foodborne Pathog Dis.* 13(3):119–127.

Molina-López RA, Vidal A, Obón E, Martín M, Darwich L. 2015. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Monophasic Variant 4,12:i:- Isolated from Asymptomatic Wildlife in a Catalanian Wildlife Rehabilitation Center, Spain. *Journal of Wildlife Diseases.* 51(3):759–763.

Moore G, Griffith C. 2002. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology.* 19(1):65–73.

Møretrø T, Vestby LK, Nesse LL, Storheim SE, Kotlarz K, Langsrud S. 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against Salmonella from the feed industry. *J Appl Microbiol.* 106(3):1005–1012.

Motsoela C, Collison EK, Gashe BA. 2002. Prevalence of Salmonella in two Botswana abattoir environments. *J Food Prot.* 65(12):1869–1872.

Mritunjay SK, Kumar V. 2017. A study on prevalence of microbial contamination on the surface of raw salad vegetables. *3 Biotech.* 7(1):13.

Muehlenbein MP, Wallis J. 2014. Considering risks of pathogen transmission associated with primate-based tourism. In: Russon AE, Wallis J, editors. Primate Tourism: A Tool for Conservation? [Internet] Cambridge: Cambridge University Press. p. 278–291. [citado el 4 de Junio del 2021]. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/books/primate-tourism/considering-risks-of-pathogen-transmission-associated-with-primatebased-tourism/295EADE418FBBB883DFCD6C59F79C37B>.

Munnoch SA, Ward K, Sheridan S, Fitzsimmons GJ, Shadbolt CT, Piispanen JP, Wang Q, Ward TJ, Worgan TLM, Oxenford C, et al. 2009. A multi-state outbreak of *Salmonella* Saintpaul in Australia associated with cantaloupe consumption. *Epidemiology & Infection*. 137(3):367–374.

Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, et al. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 399(10325):629–655.

Muñoz-Vargas L, Finney SK, Hutchinson H, Masterson MA, Habing G. 2017. Impact of Clinical Salmonellosis in Veal Calves on the Recovery of *Salmonella* in Lymph Nodes at Harvest. *Foodborne Pathog Dis*. 14(11):678–685.

National Research Council (US) Committee on Occupational Health and Safety in the Care and Use of Nonhuman. 2003. Identifying Infectious Hazards Associated with the Use of Nonhuman Primates in Research. National Academies Press (US). [Internet]. [citado el 25 de Mayo del 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK43452/>.

National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal. 2003. Microbiological Problems in Nonhuman Primates Used in Research. National Academies Press (US). [Internet]. [Citado el 24 de Mayo del 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK221778/>.

Nelson RJ, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ. 2002. Seasonal Patterns of Stress, Immune Function, and Disease. Cambridge: Cambridge University Press. [Internet]. [citado el 8 de Junio 2021]. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/books/seasonal-patterns-of-stress-immune-function-and-disease/E3B41512025A65BBA2DF8312C439BD2C>.

Nizeyi JB, Innocent RB, Erume J, Kalema GR, Cranfield MR, Graczyk TK. 2001. Campylobacteriosis, salmonellosis, and shigellosis in free-ranging human-habituated mountain gorillas of Uganda. *J Wildl Dis.* 37(2):239–244.

Ocholi RA, Enurah LU, Odeyemi PS. 1987. Fatal Case of Salmonellosis (*Salmonella pullorum*) in a Chimpanzee (*Pan troglodytes*) in the Jos Zoo. *Journal of Wildlife*

Diseases. 23(4):669–670.

Oliveira CJB, Carvalho LFOS, Garcia TB. 2006. Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiol Infect.* 134(1):199–209.

OPS/OMS. [Internet]. 2016. Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, Implicaciones para la salud publica en las Américas. [citado el 4 Ene 2022] Disponible en:

https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50636/EpiUpdate10June%202016_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y.

Pakalniskiene J, Falkenhorst G, Lisby M, Madsen SB, Olsen KEP, Nielsen EM, Mygh A, Boel J, Mølbak K. 2009. A foodborne outbreak of enterotoxigenic *E. coli* and *Salmonella* Anatum infection after a high-school dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiology & Infection.* 137(3):396–401.

Perpiñán D, Grifols J, Bargallo F. 2017. Veterinary care of small New World primates. *In Practice.* 39:355–362.

Pires SM, Vieira AR, Hald T, Cole D. 2014. Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates. *Foodborne Pathog Dis.* 11(9):667–676.

Pitout JDD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 8(3):159–166.

Plaza-Rodríguez C, Alt K, Grobbel M, Hammerl JA, Irrgang A, Szabo I, Stingl K, Schuh E, Wiehle L, Pfefferkorn B, et al. 2021. Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany? *Front Vet Sci.* 7. [Internet]. [citado el 11 de Junio del 2021]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.627821/full>. doi:10.3389/fvets.2020.627821.

Poppe C, Martin L, Muckle A, Archambault M, McEwen S, Weir E. 2006. Characterization of antimicrobial resistance of Salmonella Newport isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada. *Can J Vet Res.* 70(2):105–114.

Quiroz-Santiago C, Rodas-Suárez Or, Vázquez Q. Cr, Fernández Fj, Quiñones-Ramírez Ei, Vázquez-Salinas C. 2009. Prevalence of Salmonella in Vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection.* 72(6):1279–1282.

Raufu IA, Odetokun IA, Oladunni FS, Adam M, Kolapo UT, Akorede GJ, Ghali IM, Ameh JA, Ambali A. 2015. Serotypes, antimicrobial profiles, and public health significance of Salmonella from camels slaughtered in Maiduguri central abattoir, Nigeria. *Vet World.* 8(9):1068–1072.

Rawlinson S, Ciric L, Cloutman-Green E. 2019. How to carry out microbiological sampling of healthcare environment surfaces? A review of current evidence. *Journal of Hospital Infection*. 103(4):363–374.

Reche MP, Jiménez PA, Alvarez F, García de los Rios JE, Rojas AM, de Pedro P. 2003. Incidence of salmonellae in captive and wild free-living raptorial birds in central Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 50(1):42–44.

Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*. 22(8):438–445.

Renquist DM, Whitney RA. 1987. Zoonoses acquired from pet primates. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 17(1):219–240. doi:10.1016/s0195-5616(87)50614-3.

Review on Antimicrobial Resistance. 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. [Internet]. [citado 2019 Sep 09]. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf

Richter ER, al-Sheddy I. 1990. Microbiological quality and safety of zoo food. *Appl*

Environ Microbiol. 56(4):877–880.

Ripple WJ, Abernethy K, Betts MG, Chapron G, Dirzo R, Galetti M, Levi T, Lindsey PA, Macdonald DW, Machovina B, et al. 2016. Bushmeat hunting and extinction risk to the world's mammals. R Soc Open Sci. 3(10).

Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. 2017. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. BioMed Res Int. 2017.

Sanchez S, Hofacre CL, Lee MD, Maurer JJ, Doyle MP. 2002. Animal sources of salmonellosis in humans. J Am Vet Med Assoc. 221(4):492–497.

dos Santos LDR, Furlan JPR, Ramos MS, Gallo IFL, de Freitas LVP, Stehling EG. 2020. Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-7* and clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental and fecal samples. Arch Microbiol. 202(7):1795–1800.

Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K, Langley JM, Wanke C, Warren CA, Cheng AC, et al. 2017. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. Clin Infect Dis. 65(12):e45–e80.

Silva-Hidalgo G, López-Moreno HS, Ortiz-Navarrete VF, Juárez-Barranco F, López-

Valenzuela M. 2012a. Excreción fecal de *Salmonella* Albany, su aislamiento en la ración alimenticia y repercusión en el estado de salud de un ocelote (*Leopardus pardalis*) en cautiverio. *Veterinaria México*. 43(1):59–69.

Silva-Hidalgo G., Ortiz-Navarrete VF, Alpuche-Aranda CM, Rendón-Maldonado JG, López-Valenzuela M, Juárez-Barranco F, López-Moreno HS. 2012b. Non-typhi *Salmonella* serovars found in Mexican zoo animals. *Research in Veterinary Science*. 93(3):1132–1135. doi:10.1016/j.rvsc.2012.03.005.

[SINAC] Sistema Nacional de Áreas de Conservación. 2019. “Informe Anual Estadísticas SEMEC 2018: SINAC en Números”. Comp. B Pavlotzky. San José, CR. 82 p.

[SINAC] Sistema Nacional de Áreas de Conservación. [Internet]. 2019. Más arrestos tras operativos en Parques Nacionales. [citado el 9 de Septiembre del 2019]. Disponible en: [https://www.facebook.com/cr.sinac/posts/2038838552867659?__xts__\[0\]=68.ARDalMGVidORq3_J5_ifL1NZvYzV5Q11Bh6TLZYOezgYclt22SDz0zLRW6Q1ra-l3o9y4sY-GlyFqVO_KCwb0R8HigBadndaZSUUCoLJbg1cOha03m3MnHm7PvPEplBY7x9a-gtaNBGZdGubzi18GtuoHtIEyyzBKCx5clw8mYJpsPKUHQ32qGU1W2dcpcGFIjUc3Ai7vagyipFni5vnkKKhHYKB5UpuBPtNguTolqZhBkEQXXQmkAwXPWBVv69VyAp-exf5plGSVGqww5mLYqfTnUx8p8M_XSgFzToQvfWlWsnYRoGfxwlcWg9BQ0cyqSaTB2P1WABMX8KJwhtR9wtRQ&__tn__=-R](https://www.facebook.com/cr.sinac/posts/2038838552867659?__xts__[0]=68.ARDalMGVidORq3_J5_ifL1NZvYzV5Q11Bh6TLZYOezgYclt22SDz0zLRW6Q1ra-l3o9y4sY-GlyFqVO_KCwb0R8HigBadndaZSUUCoLJbg1cOha03m3MnHm7PvPEplBY7x9a-gtaNBGZdGubzi18GtuoHtIEyyzBKCx5clw8mYJpsPKUHQ32qGU1W2dcpcGFIjUc3Ai7vagyipFni5vnkKKhHYKB5UpuBPtNguTolqZhBkEQXXQmkAwXPWBVv69VyAp-exf5plGSVGqww5mLYqfTnUx8p8M_XSgFzToQvfWlWsnYRoGfxwlcWg9BQ0cyqSaTB2P1WABMX8KJwhtR9wtRQ&__tn__=-R)

Simpson KMJ, Hill-Cawthorne GA, Ward MP, Mor SM. 2018. Diversity of Salmonella serotypes from humans, food, domestic animals and wildlife in New South Wales, Australia. *BMC Infectious Diseases*. 18(1):623.

Singla SL, Kaur M, Lal S. 1997. Monkey bites: A public health problem in urban settings. *Indian Journal of Public Health*, 41(1), 3–5. 24.

Smith WA, Mazet JAK, Hirsh DC. 2002. Salmonella in California Wildlife Species: Prevalence in Rehabilitation Centers and Characterization of Isolates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 33(3):228–235.

Solano-Rojas, D. [Internet]. 2021. *Saimiri oerstedii*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021: e.T19836A17940807. [Citado el 15 de Junio del 2022] Disponible en: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T19836A17940807.en>

Soto SM, Martínez N, Guerra B, González-Hevia MA, Mendoza MC. 2000. Usefulness of genetic typing methods to trace epidemiologically Salmonella serotype Ohio. *Epidemiol Infect*. 125(3):481–489.

Soyer Y, Switt AM, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Root T, Warnick LD, Gröhn YT, et al. 2009. Salmonella enterica Serotype 4,5,12:i:–, an Emerging Salmonella Serotype That Represents Multiple Distinct Clones.

Journal of Clinical Microbiology. 47(11):3546–3556.

Spickler AR, Leedom Larson K. [Internet]. 2013. Salmonellosis. [Citado el 15 de Junio del 2019] Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>.

Struhsaker T. 1999. Primate communities in Africa: Consequences of long-term evolution or the artifact of recent hunting? In Fleagle JG, Janson C, Reed KE, editores, Primate communities. Cambridge: Cambridge University Press.

Tijerino Ayala A, Oropeza Barrios G, Sanchez Salazar LM, Vargas Morales JL, Duarte Martinez F, Bolaños Acuña HM, Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología. [Internet]. 2020. Informe de vigilancia basada en laboratorio: Salmonella spp. Costa Rica, 2018. [Citado el 15 de Junio del 2022] Disponible en: https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2020/CN_RB/Vigilancia%20de%20laboratorio%20de%20Salmonella%20spp.,%20Costa%20Rica%202018.pdf.

Thorpe KE, Joski P, Johnston KJ. 2018. Antibiotic-Resistant Infection Treatment Costs Have Doubled Since 2002, Now Exceeding \$2 Billion Annually. Health Affairs. [Internet]. [citado 2019 Ago 19] Disponible en : <https://www.healthaffairs.org/doi/pdf/10.1377/hlthaff.2017.1153>.
doi:10.1377/hlthaff.2017.1153.

Tribe G, Fleming M. 1983. Biphasic enteritis in imported cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys infected with *Shigella*, *Salmonella* and *Campylobacter* species. *Lab Anim.* 17(1):65–69.

Varma JK, Marcus R, Stenzel SA, Hanna SS, Gettner S, Anderson BJ, Hayes T, Shiferaw B, Crume TL, Joyce K, et al. 2006. Highly Resistant *Salmonella* Newport-MDRampC Transmitted through the Domestic US Food Supply: A FoodNet Case-Control Study of Sporadic *Salmonella* Newport Infections, 2002–2003. *J INFECT DIS.* 194(2):222–230.

Virginia Department of Health. 2018. Non-Human Primates – Environmental Epidemiology [Internet]. [citado 2018 Nov 30]. Disponible en: <http://www.vdh.virginia.gov/environmental-epidemiology/zoonoses/non-human-primates/>.

Vittecoq M, Godreuil S, Prugnolle F, Durand P, Brazier L, Renaud N, Arnal A, Aberkane S, Jean-Pierre H, Gauthier-Clerc M, et al. 2016. Antimicrobial resistance in wildlife. *Journal of Applied Ecology.* 53(2):519–529.

Webb SE, McCoy MB. 2014. Ecotourism and primate habituation: Behavioral variation in two groups of white-faced capuchins (*Cebus capucinus*) from Costa Rica. *Revista de Biología Tropical.* 62(3):909–918.

Wellcome Trust. 2015. Genomic and Epidemiological Surveillance of Bacterial Pathogens Course Manual. San Jose, Costa Rica.

[WHO] World Health Organization. [Internet]. 2016. WHO | United Nations meeting on antimicrobial resistance [citado 9 de Septiembre del 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.2471/BLT.16.020916>.

[WHO] World Health Organization. [Internet]. 2018. *Salmonella* (no tifoidea). World Health Organization [citado 3 de septiembre del 2018]. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).

[WHO] World Health Organization. [Internet]. 2018. Resistencia a los antibióticos. World Health Organization [citado 26 de septiembre del 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos>.

[WHO] World Health Organization. [Internet]. 2018 . The top 10 causes of death. World Health Organization [citado 17 de Septiembre del 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

[WHO] World Health Organization. 2018. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

[WHO] World Health Organization. [Internet]. 2022. Multi-country outbreak of Salmonella Typhimurium linked to chocolate products – Europe and the United States of America. [citado el 18 de Mayo del 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON369>.

Williams-Guillén, K., Rosales-Meda, M., Méndez-Carvajal, P.G., Solano-Rojas, D., Urbani, B. & Lynch Alfaro, J.W. [Internet].2021. Cebus imitator (amended version of 2020 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T81265980A191708420. [citado el 10 de Agosto del 2022]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T81265980A191708420.en>.

Work TM, Dagenais J, Stacy BA, Ladner JT, Lorch JM, Balazs GH, Barquero-Calvo E, Berlowski-Zier BM, Breeden R, Corrales-Gómez N, et al. 2019. A novel host-adapted strain of Salmonella Typhimurium causes renal disease in olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) in the Pacific. *Sci Rep.* 9(1):9313.

World Bank. [Internet]. 2016. By 2050, drug-resistant infections could cause global economic damage on par with 2008 financial crisis. [citado el 19 de agosto del 2019] Disponible en : <https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis>.

Woods R, Reiss A, Cox-Witton K, Grillo T, Peters A. 2019. The Importance of Wildlife Disease Monitoring as Part of Global Surveillance for Zoonotic Diseases: The Role of Australia. *Trop Med Infect Dis.* 4(1).

Xiang Y, Li F, Dong N, Tian S, Zhang H, Du X, Zhou X, Xu X, Yang H, Xie J, et al. 2020. Investigation of a Salmonellosis Outbreak Caused by Multidrug Resistant Salmonella Typhimurium in China. *Frontiers in Microbiology.* 11. [Internet]. [Citado el 18 May 2022]. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00801>.

Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(6):1271–1272.

Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(8):1647–1650.

Zachary JF, McGavin MD. 2016. *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* Elsevier Health Sciences. EEUU. 1318e1.p

Zhao S, Qaiyumi S, Friedman S, Singh R, Foley SL, White DG, McDermott PF, Donkar T, Bolin C, Munro S, et al. 2003. Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals. *J Clin Microbiol.* 41(12):5366–5371.

17. ANEXOS

Anexo1.

Estudios de Prevalencia de *Salmonella* relacionado a Animales Silvestres en Cautiverio.

Autores, año y Revista	País (duración del muestreo)	Muestras (n de animales)	Muestras o Animales Positivos (n)	Prevalencia (%)	Observaciones
Milton et al., 2018. <i>Epidemiology and Infection</i>	India	314 Muestras: Rumiantes (126) No Rumiantes (86) Aves (102)	Rumiantes (1) No Rumiantes (4) Aves (5) Total 10	Rumiantes (0.8) No Rumiantes (4.6) Aves (4.9) Total 3.1	Agua y comida 26 muestras, prevalencia de 3.8%. Prevalencia total 4.3 (Animales, cuidadores, alimento y agua)
Farias et al., 2015. <i>Zoonoses & Public Health</i>	Ohio, EEUU (6 meses)	225 Muestras: Mamíferos (31)	56 muestras de heces	24.9	56 muestras ambientales, 6 positivas (10.7 %). 38 muestras alimentarias, 6 positivas (15.8%)
Molina-López, Vidal, Obón, Martín, & Darwich, 2015 <i>Journal of Wildlife Disease</i>	España (9 meses)	263 Muestras: Mamíferos (50), aves (169) y reptiles (44)	Mamíferos (1) Aves (8) Reptiles (2) Total (11)	Mamíferos (2) Aves (4,7) Reptiles (5) Total (4.2)	
Calderón, 2013. <i>Revista Colombiana de Ciencia Animal</i>	Colombia	30 Muestras: Primates (10)	8 animales	80	10 primates de un centro, solo uno con diarrea
Silva-Hidalgo et al., 2012. <i>Research in Veterinary Science</i>	México (2007-2008)	245 Muestras: Animales Cautiverio (220) Roedores (15) Moscas & Cucarachas (10 muestras compuestas)	Animales Cautiverio (29) Roedores, Moscas & Cucarachas (2) Total (31)	Animales Cautiverio (13.18) Roedores, Moscas & Cucarachas (8) Total (11,6)	22 muestras alimentarias, todas negativas. Muestreo en agosto-octubre-enero. No hay descripción de cuantos son mamíferos, aves o reptiles.
Jang et al., 2008 <i>Journal of Veterinary Science</i>	Korea (2m en 2006)	294 Muestras: Mamíferos (233) Aves (14)	Aves (1) Reptiles (14) Mamíferos (2)	Aves (6.7) Reptiles (30.4) Mamíferos (0.9)	

		Reptiles (46)	Total (17)	Total (5.8)	
Jijón, Wetzel, & LeJeune, 2007 <i>Journal of Zoo and Wildlife Medicine</i>	Ohio (6m en 2004)	71 Muestras: Aves (11) y Mamíferos (8)	8 Aves (2) y Mamíferos (6 en 3 Sp)	26 Aves (2) Mamíferos (3)	Prevalencia por especie
Smith, Mazet, & Hirsh, 2002 <i>Journal of Zoo and Wildlife Medicine</i>	California (1999-2000)	212 Muestras: aves (104) y mamíferos (108)	9 Aves (4) Mamíferos (5)	4.2 Aves (3.8) Mamíferos (4.6)	Animales Marinos
Gopee, Adesiyun, & Caesar, 2000 <i>Journal of Wildlife disease</i>	Trinidad & Tobago (1993-96 & 97-98)	141 Muestras de animales muertos y enfermos del 93-96. 1102 Muestras del 97-98: Mamíferos (404) Aves (435) Reptiles (173)	17 del 93-99. Del 97-98: Mamíferos (29) Aves (12) Reptiles (25) Total: 66	12 del 93-96. Del 93-93: Mamíferos (7) Aves (3) Reptiles (14) Total: 7	Estudio retrospectivo del 93-96. Estudio longitudinal de 6 meses entre 97-98

Anexo 2. Consentimiento informado

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de Investigación: Prevalencia, caracterización fenotípica y perfiles de resistencia de *Salmonella enterica* recuperada de primates no humanos de nuevo mundo, superficies y alimentos en centros de cautiverio de Costa Rica

Encargados:

Dr. Lohendy Muñoz Vargas (e-mail: lohendy.munoz.vargas@una.cr / tel: 88751614)

Dr. Mauricio Jiménez Soto (e-mail: drmjimenezsoto@hotmail.com/ tel: 83936719)

Ernesto Rojas Sánchez (e-mail: ernesto.rojas.sanchez@est.una.ac.cr / tel: 84800516)

PROPÓSITO DEL PROYECTO:

El objetivo de este estudio será estimar la prevalencia de *Salmonella* primates no humanos de nuevo mundo, superficies de contacto y alimentos en sitios de manejo en animales silvestres en cautiverio de Costa Rica. Se pretende conocer si los primates no humanos de Costa Rica pueden ser excretores asintomáticos de *Salmonella*, si los alimentos que ingieren y ambiente en que se encuentran pueden tener *Salmonella*. Asimismo, si genes de resistencia se están expandiéndose de ambientes hospitalarios y agropecuarios (donde son más frecuentes) hacia animales silvestres (donde no se esperaba encontrarlos).

¿QUÉ SE PRETENDE HACER?:

Se le realizarán visitas programadas en donde se realizarán las siguientes actividades:

Se recolectarán muestras de 4 gramos (aproximadamente una cucharada) heces de primates no humanos [mono titi (*Saimiri oerstedii citrinellus*), mono cara blanca (*Cebus imitator*), mono araña (*Ateles geoffroyi*) y mono congo (*Alouatta palliata*) lo más inmediato posible cuando defecan. Para esto se estaría observando el mono en todo momento hasta que defecue y es ahí cuando se procedería a recolectar la muestra.

Las muestras de heces se introducirán en un tubo plástico y se almacenarán en frío a <4°C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Bacteriología de Escuela de Medicina Veterinaria, UNA.

Paralelo a la toma de la muestra se anotará la siguiente información del animal: especie animal, edad o tiempo en cautiverio, sexo, terapias medicamentosas recientes y alguna otra información relevante que se considere en ese momento.

La información que cada animal aporte solo la manejarán los investigadores del proyecto. Al encargado del lugar en que se encuentre el animal se le dará un reporte con los resultados de los animales una vez concluida la investigación. La información de los animales y los consentimientos informados se guardarán, con el fin de contar con un expediente para cada participante por tiempo indefinido. La información podría ser compartida con el ente gubernamental que competa la responsabilidad y comunidad científica para tratar de aclarar incógnitas acerca del estado excretor asintomático y expansión de genes de resistencia a otros ambientes. Siempre teniendo claro la confidencialidad hacia los participantes, en ningún momento se utilizarán nombres ni información que pueda asociarse a su participación.

BENEFICIOS:

Se generarán datos sobre las poblaciones anteriormente citadas y evaluará el estado de *Salmonella* de los animales con el fin de diagnosticar qué aspectos pueden estar alterados para estudiar las posibles causas de fondo y trabajar en ellas para evitar que sigan afectándose los animales, ya que *Salmonella* puede ser un patógeno mortal para ellos. A partir de datos obtenidos se pueden formular recomendaciones de manejo para los animales y encargados del cuidado para mejorar el bienestar animal, la conservación, salud animal y pública de los lugares.

RIESGOS:

Estrés asociado a la presencia de quien colecte las muestras es el riesgo esperado. Para evitar riesgos se contará con suficientes ayudantes (Médicos veterinarios, estudiantes de veterinaria y asistentes técnicos en veterinaria) con experiencia de trabajo en vida silvestre con el fin de evitar que se perjudique la salud de los animales. Si alguna complicación mayor sucede, el animal será atendido inmediatamente en el lugar y de ser necesario trasladado al Hospital de Especies Menores y Silvestres, UNA. Se usará equipo estéril y desechable para no poner en riesgo la salud del animal. Las muestras serán tomadas y manejadas por los Médicos Veterinarios. Si durante el procedimiento usted considera que el animal está siendo sujeto de algún grado de sufrimiento más allá de lo que usted considera permisible en él, puede detener el procedimiento.

Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con los investigadores sobre este estudio y ellos deben haber contestado satisfactoriamente

todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puede obtenerla llamando o escribiendo al investigador.

Recibirá una copia de esta fórmula firmada para su uso personal.

La participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse o discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención que requiere.

Su participación en este estudio es estrictamente confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica, pero de una manera anónima, nunca revelando el nombre del participante, ni dirección, ni nada que pueda asociarse a su participación. No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

Nombre, cédula y firma del sujeto

fecha: ___/___/___

Nombre, cédula y firma del testigo

fecha: ___/___/___

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento

fecha: ___/___/___

Este consentimiento ha sido sometido a la evaluación del Comité de Bienestar Animal de la EMV bajo el oficio UNA-EMV-CBBA-OFIC-002-2019.

Anexo 3. Valores de corte de CMI para *Enterobacteriaceae*

Antibiótico	Referencia	Criterio de Interpretación		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Ampicilina	CLSI (2022)	≤ 8	16	≥ 32
Ampicilina/ Sulbactam	CLSI (2022)	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
Piperacilina/ Tazobactam	CLSI (2022)	≤ 8/4	16/4	≥ 32/4
Cefotaxima	CLSI (2022)	≤ 1	2	≥ 4
Ceftazidima	CLSI (2022)	≤ 4	8	≥ 16
Cefepima	CLSI (2022)	≤ 2	4-8	≥ 16
Imipenem	CLSI (2022)	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	CLSI (2022)	≤ 1	2	≥ 4
Amicacina	CLSI (2022)	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicina	CLSI (2022)	≤ 4	8	≥ 16
Ácido nalidixico	CLSI (2022)	≤ 16	---	≥ 32
Ciprofloxacina	CLSI (2022)	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Nitrofurantoina	CLSI (2022)	≤ 32	64	≥ 128
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	CLSI (2022)	≤ 2/38	---	≥ 4/76