

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Instituto de Ciencias Agrícolas**

**Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias**



Identificación de resistencia fenotípica y genotípica en cepas de *Salmonella spp.* Aisladas en el Noroeste de México.

**TESIS**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA:**

KARLA MICHELLE NÚÑEZ CASTRO

**DIRECTOR:**

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

ABRIL DE 2021.

La presente tesis "**Identificación de resistencia fenotípica y genotípica en cepas de Salmonella spp. Aisladas en el Noroeste de México**" realizada por la C. Karla Michelle Núñez Castro, dirigida por el Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto ha sido evaluada y aprobada por el comité particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

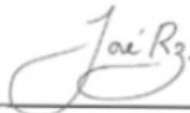
**Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Comité Particular:



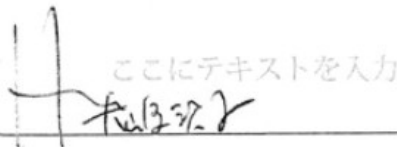
---

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto  
Director de Tesis



---

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez  
Secretario



ここにテキストを入力

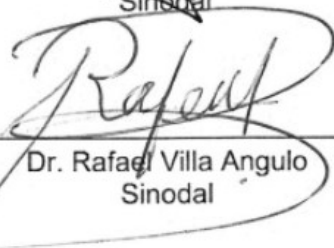
---

Dra. Sawako Oshima  
Sinodal



---

Dr. Gilberto López Valencia  
Sinodal



---

Dr. Rafael Villa Angulo  
Sinodal

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

De igual manera, agradezco el apoyo a mi director y co-director de tesis al Dr. Tomas Benjamín Rentería Evangelista y al Dr. José Carlomán Herrera Ramírez como al resto de mi comité por su excelente guía en esta tesis, por sus valiosas observaciones, sus asesorías, atender mis dudas y hacer posible la culminación de este proyecto.

Sinceras gracias: a Elsa Campos que en algún momento me apoyo en cada una de las etapas de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis padres que con su ejemplo y apoyo he podido realizar cada una de mis metas profesionales, y me han guiado y aconsejado sabiamente en los momentos difíciles.

A los amigos que encontré en esta etapa, por el apoyo, las vivencias y los momentos que más nos unieron como amigos.

A Rogeiro Ramírez Contreras por apoyarme en cualquier proyecto que me propuse, por acompañarme hasta el último momento y siempre ayudarme para mejorar personal y profesionalmente.

# ÍNDICE

## Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIA .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ABSTRACT.....	VII
RESUMEN GENERAL .....	VIII
CAPITULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN GERNERAL.....	2
CAPITULO 2 .....	4
REVISION DE LITERATURA .....	5
Taxonomia.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Morfología.....	6
Patogenia.....	6
Transmisión .....	7
Métodos de identificación .....	9
Zoonosis .....	9
Resistencia antimicrobiana .....	10
Agente antimicrobiano: $\beta$ -lactámicos .....	12
Materiales y métodos .....	14
Muestras .....	14
Susceptibilidad antibiótica .....	14
Extracción de ADN bacteriano .....	14
Detección molecular de genes de resistencia.....	14

Análisis estadístico .....	15
Resultados y discusión .....	16
Resistencia Antimicrobiana .....	16
Genes de resistencia .....	17
Bibliografía .....	19
CAPITULO 3 .....	24
II ARTICULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO .....	25
Prevalence, risk factors, and identification of <i>Salmonella</i> spp. in stray dogs of northwest Mexico	25
Prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the northwest area of Mexico	37
CAPITULO 4 .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
CONCLUSIONES .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de resistencia a antibióticos en <i>Salmonella spp.</i> .....	15
Cuadro 2. Perfiles de resistencia fenotípica y genotípica de <i>Salmonella spp.</i> .....	18

## ABSTRACT

In Mexico every cases of gastrointestinal problems are reported each year, where the causal agent is identified as *Salmonella spp.* The emergence of resistant *Salmonella* strains has caused concern in animal health and public health because the treatments no longer have the expected effect. The appearance of multi-resistant *Salmonella* represents serious limitations on the possibilities of effective treatment in infections by this pathogen. Today this type of multi-resistant strains is more frequent and has been increasing in recent years. A total of 29 strains of *Salmonella spp.* were analyzed; isolated and identified in previous studies (Núñez et al. 2019; Rivera 2019). In addition, 2 strains of *S. typhimurium* (ATCC 14028, ST) were included as reference strains. The susceptibility of 12 antibiotics was determined by the agar diffusion technique, using agar disk diffusion. The endpoint PCR technique was used for the detection of antibiotic resistance genes. In the findings of the present work, the high percentage of resistance presented by the strains analyzed against the antibiotics belonging to the group of  $\beta$ -lactams is evident, likewise several studies have reported high percentages of resistance that *Salmonella* presents against this group of antibiotics.



## RESUMEN GENERAL

En México cada año se reportan casos de problemas gastrointestinales, donde el agente causal es identificado como *Salmonella spp.* La aparición de cepas de resistentes ha causado preocupación en salud animal y salud pública debido a que los tratamientos ya no tienen el efecto esperado. La aparición de *Salmonella* multi resistentes, plantea limitaciones graves en las posibilidades del tratamiento eficaz en infecciones por este patógeno. Hoy en día este tipo cepas multirresistentes son más frecuentes ya que ha ido en aumento en años recientes. Se analizaron un total de 29 cepas de *Salmonella*.; aisladas e identificadas en estudios anteriores (Núñez y col. 2019; Rivera 2019). Además, se incluyeron 2 cepas de *S. typhimurium* (ATCC 14028, ST) como cepas de referencia. Se determinó la susceptibilidad de 12 antibióticos mediante la técnica de difusión en agar, utilizando sensidiscos. Se utilizó la técnica de PCR punto final para la detección de genes de resistencia a antibióticos. En los hallazgos del presente trabajo, se hace evidente el alto porcentaje de resistencia que presentaron las cepas analizadas frente a los antibióticos pertenecientes al grupo de los  $\beta$ -lactámicos, así mismo diversos estudios han reportado altos porcentajes de resistencia que presenta *Salmonella* frente a este grupo de antibiótico

## CAPITULO 1

## INTRODUCCIÓN GERNERAL

*Salmonella* ha sido reconocido mundialmente como un patógeno zoonótico de importancia mundial provocando problemas gastrointestinales. Es un organismo que habita en el tracto intestinal de humanos y animales, por lo cual la excreción de éste, es fuente de contaminación de alimentos, agua y medio ambiente (Turnbull 1979). En México cada año se reportan casos de problemas gastrointestinales, donde el agente causal es identificado como *Salmonella spp.* La transmisión de esta enfermedad por medio de perros a humanos puede ocurrir por la diseminación de este patógeno en el medio ambiente a través de material fecal. En perros, este agente infeccioso ha sido aislado de casas y clínicas veterinarias, aunque la mayoría de los casos son aislados de perros callejeros, ya que estos pueden eliminar el agente infeccioso sin ningún control en el medio ambiente (Núñez 2019). Se han reportado 53 serotipos de *Salmonella spp.* en perros, incluyendo aquellas que son patógenas para los seres humanos (Fonnegra et al., 2009). Se estima que los costos de atención y de apoyo debido a una infección por *Salmonella*, oscila, entre los 12 a 15 millones de dlls en promedio al año en donde se incluyen, costos de prevención, atención de la salud de las mascotas y la salud pública (Sthehr-Green 1987). La aparición de cepas de *Salmonella* resistentes ha causado preocupación en salud animal y salud publica debido a que los tratamientos ya no tienen el efecto esperado. En la actualidad la presencia de cepas resistentes en todo el mundo, ha causado un gran problema en la terapéutica de esta enfermedad debido a que los antibióticos utilizados comúnmente ya no funcionan o no tienen el efecto deseado. Debido a esta problemática, existe un interés a nivel mundial de conocer el alcance de este patógeno tanto en humanos como perros, ya que se está presentando un problema de resistencia a los antibióticos, con la finalidad de evitar el aumento de riesgos en salud pública y animal.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación es darle seguimiento a las muestras aisladas de *Salmonella* en proyectos pasados realizados por el Cuerpo

Académico de Salud Animal del IICV, con el fin de conocer la situación en cuanto a la resistencia fenotípica y genotípica de este patógeno en la región.

## CAPITULO 2

## REVISION DE LITERATURA

Microorganismos del género *Salmonella* corresponden al agente etiológico para la enfermedad denominada como Salmonelosis (OIE, 2016). En perros y gatos, la forma más común es diarrea aguda, con o sin septicemia (The center for food security and public health). La manifestación más común de la enfermedad es la entérica, pero también se pueden observar un espectro amplio de síntomas clínicos (OIE, 2016). También es posible observar neumonía, abscesos, meningitis, osteomielitis, celulitis o conjuntivitis (The center for food security and public health).

Se han reportado 53 serotipos de *Salmonella spp.* en perros, incluyendo aquellas que son patógenas para los seres humanos (Fonnegra et al., 2009).

La mayoría de las personas tienen animales de compañía en sus casas, este tipo de relación juega un rol importante en la propagación de *Salmonella spp.* hacia sus propietarios, pues esta bacteria se encuentra presente en perros y puede ser fuente de infección para los humanos (Chen et al., 2010).

Las infecciones humanas por *Salmonella* se han clasificado principalmente a *S. tifoidea* y *S. No tifoidea* (Okoro et al., 2012). Otras cepas de *Salmonella* (p. ej., *Salmonella choleraesuis*) están adaptadas a los animales y producen una enfermedad grave cuando infectan al ser humano. La mayoría de las infecciones son consecuencia de la ingestión de productos alimentarios contaminados, y, en los niños, de una transmisión directa vía fecal-oral (Hoelzer et al., 2011 y Varga et al., 2013).

### **Taxonomía**

La familia Enterobactereaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. Dentro de los géneros de

importancia clínica se encuentra *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, etc. (García et al., 2010).

El género *Salmonella* está conformada por dos especies: *Salmonella enterica* y *S. bongori*. *Salmonella enterica* se subdivide, a su vez en seis subespecies (Caffer et al., 2001).

*Salmonella spp.* es el grupo más complejo de todas las enterobacterias con más de dos mil cuatrocientos serotipos descritos en el esquema Kauffman White, determinados por la composición de los antígenos somáticos (O), flagelares (H), o de superficie Vi (Parra et al., 2002).

### **Morfología**

Bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no hemolíticos, lactosa-negativos, oxidasa-negativos (Jong et al., 2012). Poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo. Su tamaño oscila de 0,3 a 1  $\mu\text{m}$  x 1,0 a 6,0  $\mu\text{m}$ ). Entre otras características bioquímicas se cuenta la reducción de nitratos a nitritos, utilizan citrato como única fuente de carbono, producen H<sub>2</sub>S y son ureasa negativos. (Parra et al., 2002).

La membrana externa hace al microorganismo susceptible a la desecación. Todas las serovariedades de *Salmonella* son móviles, excepto las adaptadas a aves, *S. pullorum* y *S. gallinarum*. La *Salmonella* patógena, excepto *S. typhi*, producen ácido y gas en la fermentación de los carbohidratos, distinguiéndose así de las shigelas que producen solo ácido. El lipopolisacárido consiste en un polisacárido externo somático O, un núcleo polisacárido (antígeno común) y un lípido A (endotoxina) (Jong et al., 2012).

### **Patogenia**

*Salmonella spp.*, es un microorganismo altamente patógeno tanto para animales como humanos (Chen et al., 2010). Las principales fuentes de infección en el ser humano son las aves de corral, los huevos, los productos lácteos y los productos preparados sobre superficies contaminadas (Majowicz et al., 2010). En

humanos, la enfermedad más común son las fiebres tifoideas y la gastroenteritis. La ingestión de alimentos conteniendo 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> *Salmonella* viables deriva en la colonización del intestino delgado y grueso. La aparición de la enfermedad ocurre 8 a 48 horas después de la ingesta. Los síntomas incluyen un repentino dolor de cabeza, escalofríos, vómitos y diarrea, seguido de fiebre durante varios días. Esta enfermedad normalmente desaparecerá sin intervención en 2 o 3 días (Madigan et al., 2004). La incidencia de la enfermedad es más elevada en niños menores de 5 años y en adultos mayores de 60 años, que se infectan. (Murray et al., 2006). Existen las siguientes cuatro infecciones clínicas por *Salmonella*: gastroenteritis, septicemia, fiebre entérica y colonización asintomática.

En el caso de los animales domésticos la salmonelosis tiene consecuencias que varían desde un estado de portador subclínico a la septicemia fatal aguda. La *Salmonella* a menudo se localiza en la mucosa del íleon, ciego y colon, y en los ganglios linfáticos infectados. La mayoría de los organismos son eliminados de los tejidos, la infección subclínica puede persistir dando la eliminación de pequeñas concentraciones de microorganismos por las heces. Los animales jóvenes y débiles y los de mayor edad son susceptibles y pueden desarrollar la forma septicémica de la enfermedad (Quinn et al., 2002).

### **Transmisión**

*Salmonella* necesita colonizar la porción distal del intestino delgado o el colon para iniciar la enfermedad entérica. Los ácidos orgánicos volátiles producidos por la flora anaeróbica normal del animal inhiben el crecimiento de *Salmonella* y la flora normal usualmente bloquea el acceso al sitio de unión requerido por las especies de *Salmonella*. Alteración de la flora normal del intestino por factores como terapia de antibióticos, dieta y privación de agua incrementa la susceptibilidad del huésped a la infección (Quinn et al., 1994). La dosis infectante es de 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> UFC (Jong et al., 2012).

Después de ser ingeridas y pasar a través del estómago, la bacteria es capaz de invadir y replicarse en las células M (micropliegues) que se localizan en las placas



de Peyer de la región terminal del intestino delgado. Típicamente estas células transportan antígenos de cuerpos extraños hasta los macrófagos subyacentes para su eliminación (Figura 2) (Ibarra et al., 2009) (Longo et al., 2012).

La internalización de *Salmonella* en la célula hospedero, es mediada por dos distintos procesos. Los macrófagos utilizan la absorción fagocítica para reconocer e internalizar las bacterias patógenas. *Salmonella* puede invadir ambas células tanto fagocíticas como no fagocíticas utilizando la secreción tipo III (T3SS), T3SS1. El mecanismo de fagocitosis de las bacterias gram negativas es compleja e involucra múltiples receptores, algunos de los cuales aumentan la eficiencia de la absorción y otros que activan diferentes vías de señalización en el fagocito. Los receptores de reconocimiento de patrones, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, incluidos lipopolisacáridos (LPS) y flagelos, y la unión a ligando, cualquiera de los dos en la superficie de la célula o dentro del fagosoma, puede afectar la maduración del fagosoma, señalización y expresión de genes. En un proceso coordinado, un pequeño grupo de proteínas efectoras (SipA, SipC, SopB/SigD, SopD, SopE2 y SptP) inducen reordenamiento del citoesqueleto de actina lo que resulta en masivas alteraciones localizadas de la membrana y una rápida internalización de las bacterias. La respuesta inflamatoria limita la infección al aparato digestivo, interviene en la liberación de prostaglandinas y estimula la secreción activada de AMPc y líquidos. Las especies de *Salmonella* se protegen también de los ácidos del estómago y del pH ácido del fagosoma mediante un gen de respuesta de tolerancia a los ácidos (ATR). La catalasa y el superóxido dismutasa son otros factores que protegen a las bacterias frente a la destrucción intracelular (Ibarra et al., 2009).

Las cepas invasivas que producen septicemia son capaces de escapar a la destrucción por el hospedero y multiplicarse dentro de los macrófagos del hígado y el bazo, así como intravascularmente. La habilidad invasiva de algunas cepas de *S. typhimurium* es incrementada por la presencia de genes llevados en un plásmido pR(ST98). La destrucción dentro de la corriente sanguínea es impedida por unidades O-repetidas en la membrana lipopolisacárida. Se piensa que estos

pueden enmascarar factores determinantes en la superficie de la bacteria que podrían normalmente unir complementos y activarlos por medio de vías alternas. Esto puede reducir las oportunidades de quimiotaxis, opsonización y fagocitosis. Cualquier *Salmonella*, en animales no inmunes, que es fagocitada tiende a sobrevivir dentro del fagocito. La *Salmonella* invasiva secreta sideróforos que remueven el hierro que está unido a proteínas del hospedero. La multiplicación de estos microorganismos en el cuerpo lo lleva a una severa endotoxemia. Algunos serotipos parecen ser más invasivos que otros. Cepas invasivas más frecuentes son *S. typhi*, *S. dublin*, y *S. typhimurium* (Jong et al., 2012).

### **Métodos de identificación**

De los métodos convencionales para la identificación de Salmonelosis se encuentra el análisis microbiológico (aislamiento bacteriano, pruebas bioquímicas, tinciones diferenciales), con este se puede establecer que patógeno está causando la infección y determinar las medidas correspondientes para evitar su diseminación. En conjunto con las 23 pruebas bioquímicas estandarizadas (API® 20E) método rápido para la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos gram negativos. A la par con pruebas serológicas (ELISA y por aglutinación) que consisten en la caracterización de los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y del antígeno capsular (Vi) de las bacterias y PCR (método molecular) que ofrece una elevada sensibilidad en la identificación de patógenos, es eficaz cuando se obtienen muestras con muy baja concentración de patógenos, o que son difíciles de reproducir en medios de cultivo. Al ser diferentes las técnicas de diagnóstico, estas se complementan para llegar a la identificación de *Salmonella spp.* ya que una vez obtenido un aislado puro, se puede realizar algunas pruebas bioquímicas (tinción gram, catalasa) para diferenciar entre algunos patógenos y así posteriormente llevar a cabo las diferentes técnicas para identificar *Salmonella spp.* lo que nos ayuda a tomar medidas de control y prevención para disminuir la prevalencia de salmonelosis.

### **Zoonosis**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2018 enfermaron 550 millones personas de problemas gastrointestinales, de las cuales 220 millones son niños menores de 5 años. *Salmonella* spp. es una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estima que *Salmonella* causa aproximadamente 1.2 millones de enfermedades, 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes en Estados Unidos, anualmente. A diferencia de esto, en México se estima que se presentan más de 16 millones de casos de fiebre tifoidea por año, con aproximadamente 6 millones de decesos, y 1 300 millones de casos de gastroenteritis con una mortalidad de 3 millones (Hernandez et al 2011). Sin embargo, se reportó que la morbilidad en 2003 debido a paratifoidea y otras salmonelosis se encontraba en el vigésimo cuarto lugar dentro de todas las causas de enfermedad, con 103,815 casos y una incidencia de 99.62. En 2008, ocupó el décimo noveno lugar, con 122,422 casos y una incidencia de 114.75. Los estados en los que se ha reportado el mayor número de casos son: Tabasco, Chiapas, Coahuila, Sinaloa, y Veracruz. (Hernandez et al 2011). Vb Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero (Zaidi, et al. 2006). Respecto a la prevalencia de *Salmonella* en perros, tenemos que Jay-russel y colaboradores reportaron en 2014 una prevalencia de 9.2% (33/358), años después, Reimschuessel y colaboradores reportaron en 2017 una prevalencia del 2.5% (60/2,422) de *Salmonella* en perros.

### **Resistencia antimicrobiana**

La aparición de cepas de *Salmonella* resistentes ha causado preocupación en salud animal y salud pública debido a que los tratamientos ya no tienen el efecto esperado. En la actualidad la presencia de cepas resistentes en todo el mundo, ha causado un gran problema en la terapéutica de esta enfermedad debido a que los antibióticos utilizados comúnmente ya no funcionan o no tienen el efecto deseado.

La resistencia a los antimicrobianos como el cloranfenicol, ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol surgió ya que son los utilizados en primera instancia y se propagan por la captación de nuevo material genético transferible. Por otro lado, la resistencia a las fluorquinolonas surge como resultado de las mutaciones en el genoma bacteriano. La aparición de *Salmonella* multirresistentes, plantea limitaciones graves en las posibilidades del tratamiento eficaz en infecciones por este patógeno, hoy en día este tipo cepas multirresistentes son más frecuentes y han ido en aumento en años recientes. Estas cepas multirresistentes surgieron a finales de 1990 e inicios del 2000 y desde entonces la prevalencia tanto en humanos como animales de compañía y especies de vida silvestre se ha expandido a nivel mundial. Debido a que la prevalencia de cepas *Salmonella* resistentes está en aumento, al igual que la resistencia a los antimicrobianos importantes como las fluorquinolonas y las cefalosporinas de tercera generación, esto se ha convertido en un problema emergente en todo el mundo ya que estos fármacos son los utilizados como plan de ataque en caso de no tener éxito con el tratamiento primario.

Esto puede deberse a que muchos de los agentes antimicrobianos utilizados tanto en perros como en otros animales son similares a los utilizados en humanos (Sternberg 1999). Se cree que el uso de antibióticos en entornos como hospitales y granjas puede aumentar la propagación de las cepas resistentes.

Las bacterias han adquirido la habilidad desarrollar resistencia antimicrobiana, lo que ha llevado a la existencia de bacterias resistentes a todos los antimicrobianos, dichos mecanismos de resistencia pueden ser adaptaciones de mecanismos que tenían otras funciones originalmente.

Estos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos al ser originados por el mismo microorganismo, como resultado de errores de replicación o al adquirir material genético que codifica a ciertos genes de resistencia. Uno de estos casos es la mutación (son transmitidas verticalmente, de célula madre a célula hija). Otro de estos mecanismos es la adquisición de material genético puede ser difundido

de una célula a otra (transmitidas horizontalmente, puede ser una bacteria de la misma especie o no).

Hasta el momento se conocen 3 mecanismos de transferencia de material genético: conjugación, transducción y transformación.

Conjugación: consiste en la transferencia de genes entre dos células que están en contacto. Es el mecanismo, más frecuente de intercambio de material genético.

Transducción: adquisición de material genético por la acción de un bacteriófago y adquiere una pequeña cantidad de ADN.

Transformación: se adquiere el ADN directo del medio ambiente cuando una bacteria ha liberado su material genético. El nuevo material genético es recombinado con el cromosoma de la bacteria receptora en regiones donde existe más homología y da lugar a genes funcionales.

Plásmidos: Son moléculas circulares, no codifican funciones esenciales para la célula. (Material genético accesorio).

Secuencia de inserción: son los transposones más pequeños, tienen dos repeticiones invertidas cortas en cada extremo y tiene una o varias pautas de lectura que codifica la transposasa.

Transposones: tienen capacidad de movimiento dentro del genoma bacteriano mediante recombinación no homóloga, pueden saltar de un lugar a otro del cromosoma o del plásmido. Los transposones dependen de la replicación del hospedador, debido a su incapacidad de replicación autónoma.

Integrones: son capaces de captar genes que codifican ciertos determinantes de resistencia a antibióticos y otras funciones. Están muy diseminados entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae* y otras gramnegativas. (Ortega 2008).

**Agente antimicrobiano:  $\beta$ -lactámicos**

Esta familia tiene un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura, por lo cual la unión de este anillo a otro secundario da origen a las diferentes clases dentro de la familia, de esta manera condicionando el espectro de acción y las propiedades farmacocinéticas.

Son bactericidas es decir que solo actuando sobre microorganismos en fase de crecimiento. El resultado bactericida se debe a la inactivación de un inhibidor de enzimas autolíticas de la pared bacteriana (autolisinas) que lleva a la lisis celular. Los receptores enzimáticos reciben el nombre de proteínas fijadoras de penicilinas (PBP-penicillin binding proteins), estas proteínas tienen la función de reorganizar la pared durante el crecimiento y división celular. El antimicrobiano se comporta como agente acilante que actúa sobre el sitio activo de las enzimas.

Los mecanismos de resistencia que desarrollaron antes los antimicrobianos son diversos: Resistencia por modificación de la diana que se produce por modificación de las PBP sobre las cuales actúan estos compuestos. Resistencia por modificación, alteración o desactivación del antibiótico.

## **Materiales y métodos**

### **Muestras**

Se analizaron un total de 29 cepas de *Salmonella* spp.; aisladas e identificadas en estudios anteriores (Núñez y col. 2019; Rivera 2019). Además, se incluyeron 2 cepas de *S. typhimurium* (ATCC 14028, ST) como cepas de referencia.

### **Susceptibilidad antibiótica**

Se determinó la susceptibilidad de 12 antibióticos (amikacina, ampicilina, cefalotina, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina, levofloxacina, netilmicina, nitrofurantoina, trimetoprim-sulfametoxazol) mediante la técnica de difusión en agar, utilizando sensidiscos de la marca Bio-Rad® para Gram negativos, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los resultados se clasificaron como resistencia intermedia, sensible y resistente, según el diámetro del halo de inhibición formado (CLSI, 2012).

### **Extracción de ADN bacteriano**

Para la extracción de ADN se utilizó el Kit DNeasy Blood and tissue (Qiagen®), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Una vez que se obtuvo el ADN se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con la finalidad de evaluar calidad y cantidad del ADN extraído.

### **Detección molecular de genes de resistencia**

Se utilizó la técnica de PCR punto final para la detección de genes de resistencia a antibióticos (cuadro 1), siguiendo la metodología descrita por Talavera y col. (2011).

**Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de resistencia a antibióticos.**

Oligonucleótidos	Secuencia 5'----- 3'	Tamaño del amplicon (pb)
SipBC-F	ACAGCAAAATGCGGATGCTT	232
SipBC-R	GCGCGCTCAGTGTAGGACTC	
cmlA-tetR-F	CGCTCCTTCGATCCCGT	260
cmlA-tetR-R	GCTGCGTTCATCTACAACAGAT	
PSE-1-F	TTTGGTTCCGCGCTATCTG	132
PSE-1-R	TACTCCGAGCACCAAATCCG	
TEM-F	GCACGAGTGGGTTACATCGA	291
TEM-R	GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	

SipB/C: sulfonamidas; cmlA/tetR: cloranfenicol, PSE-1 y TEM: ampicilina.

La reacción consistió en 2.5 µl de buffer de PCR 10×, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de dNTP's a 10 mM, 1 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmol/µl, 1 µl de Taq polimerasa (preparado en nuestro laboratorio), 2 µl de ADN bacteriano y 15 µl de agua grado molecular, con un volumen final de 25 µl. Las reacciones se sometieron a una desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 48°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos con una extensión extra de 72°C por 3 minutos y el almacenamiento final a una temperatura de 4°C.

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1x (Ph 8.0; 0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA), teñidos con 0.5 µg de bromuro de etidio/ml, corridos a 100 V por 1 hora. Se utilizó un marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, GeneRuler) para confirmar el tamaño de los productos amplificados. El gel se visualizó bajo el transiluminador de luz ultravioleta (UV) del sistema de foto-documentación de la marca UVP, modelo BioDoc-It™ Imaging System.

### **Análisis estadístico**

Frecuencias de resistencia fenotípica-genotípica.



## Resultados y discusión

De las 29 cepas analizadas el 59% (17/29) se identificaron como *S. typhimurium*, mientras que el resto de las cepas no se determinó a que serovariedad pertenecen.

### Resistencia Antimicrobiana

Del total de cepas analizadas el 100% (31/31) fueron resistentes a ampicilina (AM); el 97% (30/31) de las cepas fueron resistentes a cefepime (FEP) y cefalotina (CF); el 58% (18/31) de las cepas fueron resistentes a cefotaxima (CTX); el 19% (6/31) de las cepas fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol (STX) y cloranfenicol (CL); mientras que el 10% (3/31) de las cepas fueron resistentes a ceftriaxona (CRO) en tanto el 6% (2/31) de las cepas fueron resistentes a gentamicina (GE), netilmicina (NET), levofloxacina (LEV) y nitrofurantoina (NF). Sin embargo, cabe mencionar que ninguna de las cepas mostro resistencia a amikacina (AK), considerándose este último como alternativa para el tratamiento eficaz frente a estas cepas. Por otro lado, el 19% (6/31) de los aislados fueron considerados multidroga-resistentes, ya que presentaron resistencia > 2 familias de antibióticos (cuadro 2).

En los hallazgos del presente trabajo, se hace evidente el alto porcentaje de resistencia que presentaron las cepas analizadas frente a los antibióticos pertenecientes al grupo de los  $\beta$ -lactámicos, así mismo diversos estudios han reportado altos porcentajes de resistencia que presenta *Salmonella* frente a este grupo de antibióticos. Lo anterior se ha atribuido a que estos antibióticos son de uso común para el tratamiento de diversas infecciones, tanto en medicina humana como veterinaria. (Fernández y col., 2017; Kiflu y col. 2017; Srisanga y col., 2017; Tsai y col., 2007). A diferencia de otros estudios donde obtuvieron altos porcentajes de susceptibilidad frente a ampicilina y altos porcentajes de resistencia frente a tetraciclinas (de Carvalho y col. 2009; López y col. 2009).

Se identificaron 9 perfiles de resistencia fenotípica de los cuales destacan: ampicilina – cefepime – cefalotina – cefotaxima, por ser el perfil con mayor recurrencia (Cuadro 2). Así mismo Leonard y col. (2011) reportaron el perfil fenotípico: amoxicilina/ac.calvulánico – ampicilina – ceftiofur – ceftriaxon, como el más recurrente, evidenciando que hay cepas de *Salmonella* spp. con alta resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos. Cabe destacar que dentro de los 9 perfiles de resistencia fenotípica se identificaron cuatro como MDR (cuadro 2).

### **Genes de resistencia**

Se identificó que el 100% (31/31) de las cepas amplificaron el gen SipB/C, este confiere resistencia a sulfonamidas; el 94% (29/31) y 10% (3/31) de las cepas amplificaron los genes TEM y PSE-1 respectivamente, los cuales confieren resistencia a ampicilina; mientras que el 3% (1/31) de las cepas amplificaron el gen CmlA/tert, el cual confiere resistencia al cloranfenicol. En el análisis de los resultados se identificaron 4 perfiles genotípicos de resistencia de acuerdo con la amplificación de los genes, de los cuales destaca SipB/C – TEM, al ser el de mayor recurrencia (Cuadro 2). Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Talavera y col. (2011), dado que ellos reportan un mayor porcentaje (57.4%) en la amplificación del gen cmlA/tetR y bajos porcentajes (20.6%, 2.2% y 0%) en la amplificación de los genes TEM, PSE-1 y SipB/C, respectivamente. Sin embargo, diversos autores han reportado altos porcentajes de genes que codifican  $\beta$ -lactamasas, las cuales les confieren a *Salmonella* resistencia a los antibióticos pertenecientes al grupo de  $\beta$ -lactámicos (de Toro y col. 2014; Ahmed y Shimamoto 2012; Ahmed y col. 2009).

**Cuadro 2. Perfiles de resistencia fenotípica y genotípica de *Salmonella* spp.**

<b>ID</b>	<b>Perfil Fenotípico</b>	<b>Perfil Genotípico</b>
<b>50/17</b>	AM-CRO-NET-SXT-LEV-NF	SipB/C-TEM
<b>*51</b>	AM-FEP-CF-NF	SipB/C-TEM
<b>*70</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>120</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>*133</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>*151</b>	AM-FEP-CF	SipB/C
<b>*184</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>208</b>	AM-FEP-CF-CL	SipB/C-TEM
<b>*267</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>*268</b>	AM-FEP-CF-CTX-SXT-CL	SipB/C-TEM-PSE-1
<b>296</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>298</b>	AM-FEP-CF-CTX-CL	SipB/C-TEM
<b>*317</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>*335</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>*338</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>349</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>*352</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>354</b>	AM-FEP-CF-CTX-CRO-GE-NET-SXT-LEV	SipB/C-TEM
<b>375</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>383</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>387</b>	AM-FEP-CF-CTX-SXT-CL	SipB/C-TEM-PSE-1
<b>*396</b>	AM-FEP-CF-CTX-SXT-CL	SipB/C-TEM-PSE-1
<b>*398</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>*399</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>*411</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>*437sc</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>454</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>488</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM
<b>*501</b>	AM-FEP-CF	SipB/C-TEM
<b>*ST</b>	AM-FEP-CF-CTX-CRO-GE-SXT-CL	SipB/C-CmlA/tetr
<b>*ATCC</b>	AM-FEP-CF-CTX	SipB/C-TEM

Cepas marcadas (\*) son *S. typhimurium*; AM: Ampicilina; FEP: Cefepime; CF: Cefalotina; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; AK: Amikacina; GE: Gentamicina; NET: Netilmicina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol; CL: Cloranfenicol; LEV: Levofloxacina; NF: Nitrofurantoina.

## Bibliografía

Ahmed, A. M., Ishida, Y., & Shimamoto, T. (2009). Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *Journal of applied microbiology*, 106(2), 402-409.

Ahmed, Ashraf & Shimamoto, Tadashi. (2012). Genetic analysis of multiple antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased broilers in Egypt. *Microbiology and immunology*. 56. 254-6

Caffer M. I., R. Terragno. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Ministerio de Salud Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Departamento Bacteriología Servicio Enterobacterias Buenos Aires, Argentina.

Centers for Disease Control and Prevention 2016 (CDC) 2019. <https://www.cdc.gov/Salmonella/general/index.html>

Chen C., W. Chen, S. Chin, Y. Lai, K. Tung, C. Chiou, Y. Hsu, C. Chang. 2010. Prevalence and antimicrobial susceptibility of salmonellae isolates from reptiles in Taiwan. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:44–50.

CLSI. (2012). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement." 15th informational supplement, M100-s22, 32, 188.

de Carvalho, F. C. T., Barreto, N. S. E., dos Reis, C. M. F., Hofer, E., & dos Fernandes Vieira, R. H. S. (2009). Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará. *Revista Ciência Agronômica*, 40(4), 549-556.

de Toro, M., Seral, C., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., & Sáenz, Y. (2014). Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(1), 4-10.

Fernández Márquez, M. L., Burgos, M. J. G., Pulido, R. P., Gálvez, A., & López, R. L. (2017). Biocide tolerance and antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from hen eggshells. *Foodborne pathogens and disease*, 14(2), 89-95.

Fonnegra Peña, L. P., Londoño Gomez, L. M., & Hernandez, C. (2009). Prevalencia de *Salmonella* spp. en perros del centro de bienestar animal “La Perla”, en Medellín, Colombia

García Puerta A., F. Mateos Rodríguez. 2010. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete España. *Medicine*. 10(51): 3426-31.

Hernandez CC, Aguilera AMG, Castro EG. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *ENF INF MICROBIOL* 31 (4): 137-151

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

Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009). Salmonella--the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular microbiology*, 11(11), 1579–1586. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01368.x>

Jay-Russell MT, Hake AF, Bengson Y, Thiptara A, Nguyen T. 2014. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from stray dog and coyote feces in a major leafy greens production region at the United States-Mexico Border. *PLOS ONE* 9, e113433

de Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2012). Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS pathogens*, 8(10), e1002933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002933>

Kiflu B, Alemayehu H, Abdurahaman M, Negash Y, Egualé T. 2017. *Salmonella* serotypes and their antimicrobial susceptibility in apparently healthy dogs in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Vet Res* 13, 134.

Leonard, E. K., Pearl, D. L., Finley, R. L., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Peregrine, A. S., & Weese, J. S. (2011). Comparison of antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* recovered from pet dogs from volunteer households in Ontario (2005–06). *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 67(1), 174-181.

Longo D., L. Jameson, A. Fauci, S. Hauser, J. Loscalzo. 2012. Harrison. Principios de Medicina Interna, Decima Octava Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Capítulo 53.

López Cuevas, O., León Félix, J., Jiménez Edeza, M., & Chaidez Quiroz, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(2), 119-126.

Madigan T., M. Martinko, J. Parker. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos, Decima Edición. Editorial Pearson Prentice Hall. 951-952p.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, *et al.* 2010. International collaboration on enteric disease 'Burden of Illness' studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50, 882-889.

Murray P., K. Rosenthal, M. Pfaü. 2006. Microbiología Médica, Quinta Edición. Editorial Elsevier. 330-332p.

Núñez Castro, K. M., Trasviña Muñoz, E., García, G. F., Herrera Ramírez, J. C., López Valencia, G., Medina Basulto, G. E., ... & Rentería Evangelista, T. B. (2019).

Prevalence, risk factors, and identification of *Salmonella* spp. in stray dogs of northwest Mexico. *Austral journal of veterinary sciences*, 51(1), 0-0.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2016. Salmonelosis. En: OIE (ed). *Manual Terrestre*. OIE: Paris, Francia.

Ortega CR (2008) Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella* spp (Tesis de Doctoral). Universitat de Barcelona. Departamento de microbiología y parasitología microbiana

Parra M, Durango J, Mattar S. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *salmonella*. MVZ-CÓRDOBA 2002; 7:(2), 187-200

Quinn P., B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. C. Donnelly, F. C. Leonard, D. Maghire. 2002. Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias. Primera Edición. Editorial Acribia. 134-139p.

Quinn P., M. E. Carter, B. Markey, G. R. Carter. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Editorial Wolfe. 226-234p.

Reimschuessel, R., Grabenstein, M., Guag, J., Nemser, S. M., Song, K., Qiu, J., ... & Pabilonia, K. (2017). Multilaboratory survey to evaluate *Salmonella* prevalence in diarrheic and nondiarrheic dogs and cats in the United States between 2012 and 2014. *Journal of clinical microbiology*, 55(5), 1350-1368.

Srisanga, S., Angkititrakul, S., Sringam, P., Le Ho, P. T., Vo, A. T., & Chuanchuen, R. (2017). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes of *Salmonella* enterica isolated from pet dogs and cats. *Journal of veterinary science*, 18(3), 273-281.

Shtehr-Green JK, Schantz PM. The impact of zoonotic diseases transmitted by pets on human health and the economy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1987 Jan;17(1):1-15.

Sternberg, S., 1999: Antimicrobial resistance in bacteria in pets and horses. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 92, 37–50.

Talavera RM, Varela GJA, Reyes RNE, Lagunas BS, Valladares CB, Alonso FMU, & Velázquez OV. (2011). Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella* spp de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. *Veterinaria México*, 42(4), 269-276. Recuperado en 17 de febrero de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922011000400002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000400002&lng=es&tlng=es).

Tsai, H. J., Huang, H. C., Lin, C. M., Lien, Y. Y., & Chou, C. H. (2007). *Salmonellae* and campylobacters in household and stray dogs in northern Taiwan. *Veterinary research communications*, 31(8), 931-939.

Turnbull, P. B. C., 1979. Food poisoning with special reference to *Salmonella*: its epidemiology, pathogenesis and control. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 8: 663-714.

Varga C., D. Middleton, R. Walton, R. Savage, M. Tighe, V. Allen, R. Ahmed, L. Rosella. 2012. Evaluating risk factors for endemic human *Salmonella* enteritidis infections with different phage types in Ontario, Canada using multinomial logistic regression and a case-case study approach. *BMC Public Health*. 12:866.

Zaidi, M. B., Macías, C. L., & Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 121-125



## CAPITULO 3

## II ARTICULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO

### SHORT COMMUNICATION

#### **Prevalence, risk factors, and identification of *Salmonella* spp. in stray dogs of northwest Mexico**

**Karla M. Núñez Castro<sup>1</sup> Enrique Trasviña Muñoz<sup>1</sup> Gerardo F. García<sup>1</sup> José C. Herrera Ramírez<sup>1</sup> Gilberto López Valencia<sup>1</sup> Gerardo E. Medina Basulto<sup>1</sup> Lourdes C. Pujol Manríquez<sup>1</sup> Tomás B. Rentería Evangelista<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México.

#### **ABSTRACT:**

Salmonellosis has a worldwide relevance in aspects associated with public health, as only in 2009 were reported 93.8 million cases in humans. The objective of the study was to establish the prevalence, risk factors and bacteriological and molecular identification of *Salmonella* spp in stray dogs in urban, rural and coastal areas of Mexicali, a city in northwest Mexico. From May 2014 to February 2015, 385 dogs were tested. Sampling was performed by rectal swab and conventional bacteriological techniques were applied, for later implementation of the API 20E system and molecular identification by polymerase chain reaction (PCR). The data were analysed statistically by means of descriptive statistics and multiple logistic regression modelling. A prevalence of 6.27% was obtained in the dogs examined, the samples obtained were characterised to subspecies (*Salmonella enterica* subspecies *enterica* and *Salmonella enterica* subspecies *arizonae*). The geographical region with the highest prevalence in the study was the coast (10%), followed by the rural area (8.57%) and the urban area (5.8%), however, no significant statistical differences were detected. There was significant difference in the prevalence by age of dogs under one year ( $P < 0.05$ ). The identification

of *Salmonella* in dogs from northwest Mexico could correspond to serovars of zoonotic importance indicating a potential risk for the population.

**Keywords:** *Salmonella* spp; prevalence; stray dogs; public health

## INTRODUCTION

Historically canines have contributed to important activities and work for humans, additionally they serve as companion animals, a trend that has increased over the years. However, despite the benefits of having contact with dogs, they can be a reservoir of many infectious agents ([Kiflu et al 2017](#)). One of the most important public health infections associated with canine contact is salmonellosis, a very common and widely distributed enteric disease. During the last 40 years several articles have reported on the transmission of *Salmonella* from dogs to humans, mainly associated with the interaction existing in the domestic or service field ([Lowden 2015](#)). The Department of Health of the government reported 149,231 cases in Mexico from December 24<sup>th</sup> to December 30<sup>th</sup>, 2017, and *Salmonella* spp. was identified as the causal agent (SSA 2017). In dogs, this infectious agent has been isolated in houses and veterinary clinics; however, more cases have been isolated in stray dogs, since they can eliminate the infectious agent without any control over the environment. Currently, different serotypes of *Salmonella* have been worldwide identified in stray dogs ([Hoelzer et al 2011](#)). Several risk factors have been linked to salmonellosis; a study in Nigeria shows that medium breed dogs (Mongrel) have the highest prevalence of salmonellosis (49.5%) compared to large and small breeds (30 and 8.3%, respectively),

finding statistical difference associated with breed factor ([Jajere et al 2014](#)). This bacteria has zoonotic importance and it is characterised by causing severe disorders such as gastroenteritis, septicemia, enteric fever, and bacteremia (Andino et al/2014). In addition, the presence of salmonellosis in animals is important, since they can serve as latent carriers of this pathogen without

presenting clinical signs, releasing the microorganism into the environment, which represents a risk of infection to the human population ([Kiflu 2017](#)).

Worldwide, 93.8 million cases of gastroenteritis in humans have been reported where the etiological agent was *Salmonella* spp. ([Majowicz et al 2010](#)). In Mexico according to the government health reports 137,024, 135,221,76,429, and 149,231 cases caused by *Salmonella* bacteria have been reported from 2014 to 2017, respectively (SSA 2014, 2015, 2016, 2017), indicating a positive trend, considering a total population of 119,938,473 habitants in Mexico (INEGI 2015). The prevalence of *Salmonella* reported in Trinidad during the period from November 1995 to November 1998 in dogs from different origins (Households, Dog pound and animal shelter, Veterinary establishments, etc.) was 3.6%; 18/50 culture positive cases on animals from Dog pound and animal shelter. Although the presence of *Salmonella* isolated in other origins was higher as in the case of quarantined animals, the risk of transmission to humans due to the interaction between these two species must be considered ([Seepersadsingh et al 2004](#)).

In northwest Mexico, there is only one study in which the prevalence was determined, and *Salmonella* strains isolated from faecal dog samples were characterised. In this region, the population in 2015 (last population census) was 3,315,766 inhabitants (INEGI 2015), and a study conducted in 2004 showed a considerable proportion between the number of dogs per inhabitant in the same region, with a range of 1:4.3, respectively (Flores and Estrella 2004). A prevalence of 9.2% of *Salmonella* was obtained in dogs, with the species *Salmonella enterica* being the most prevalent (33/358) (Jay-Rusell *et al* 2014). Therefore, the objective of the study was to establish the prevalence, risk factors, and the bacteriological and molecular identification of *Salmonella* spp. in stray dogs captured by the Municipal Animal Control Center (CEMCA) in Mexicali, Baja California, Mexico.

## **MATERIAL AND METHODS**

## **Epidemiological information**

A cross-sectional epidemiological study was conducted from May 2014 to February 2015 in the city of Mexicali, in order to identify *Salmonella* spp. in healthy dogs captured by CEMCA from three city areas: the urban area of the city of Mexicali, the rural area of Mexicali valley, and the coast of San Felipe. Data recorded during the sample collection corresponded to sex (male and female), age (younger and older than one year of age), breed size (small, medium, and large dogs), body condition (good, regular, bad) and capture zone (urban, rural, and coastal area), and were used to establish associations with samples suggestive of *Salmonella*.

## **Sample size determination**

Aproximately a population of 10,870 dogs were captured by CEMCA from May 2014 to February 2015, sample size was determined using the formula described by [Thrusfield \(2007\)](#), with a 95% confidence interval (CI). Since there was no expected prevalence of *Salmonella* infections in dogs from Mexicali municipality “p” was 50%, and the and the sample size obtained for this study was 385.

## **Sample collection and bacteriological procedures**

About 75% of captured dogs by CEMCA were destined to euthanasia (8,152). Once the staff followed the approved euthanasia procedure, and average of 30-45 dogs were provided by the staff (one sampling per week); the dogs were randomly selected from those animals assigned for sampling , chosing the same amount of male and female animals until 385 samples were obtained. A rectal swab sample from euthanised dogs was taken and transported in Clary Blair (Britania<sup>®</sup>) medium, identified and stored at 4°C for transportation and analysed at the microbiology laboratory of the Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV).

Bacteriological identification of *Salmonella* was performed according to the guidelines of the World Organization for Animal Health OIE in 2016 (pre-enrich

ment, enrichment, and selective medium). Pre-enrichment was performed using Peptone water for 24 hours, then 1ml of pre-enriched culture on enrichment medium (Selenite cystine and Rappaport vassidialis broth) was taken after 24 and 42 hours, respectively, both cultures were inoculated on selective medium Hektoen enteric agar for 24 hours to select those with microbiology characteristics that correspond to *Salmonella* genus. The system API 20E (Biomerieux®, USA) was used in isolates suggestive to *Salmonella* spp.

Molecular identification from all isolates using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®) was performed by the amplification of 16S gene by polymerase chain reaction ([Rodicio et al 2004](#)). All samples were sent to Quimera Biolabs in Ensenada, Baja California, for sequencing.

The sequences obtained were reviewed at GenBank database using the “Basic Local Alignment search tool” (Blast N) algorithm of the National Center for Biotechnology Information. A 99.9% identity was considered as the minimum acceptable to determine that the sequence obtained for each isolate correspond with the studied bacteria.

### **Ethics statement**

All animal handling procedures were conducted following national code NOM-033-ZOO-1995 and the local regulation for the control of domestic animals (Ayuntamiento de Mexicali 2009). All procedures were also approved by the Institutional Committee for Animal Ethics, represented by the Academic Group of Animal Health and the Academic Group for Diagnosis of Infectious Diseases, both part of the IICV and Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

### **Statistical analysis**

The prevalence was estimated as the ratio of cases suggestive of *Salmonella* with respect to the total of samples analysed. A Chi-squared test was used to perform

the independent *Salmonella*+ frequency distribution test in the *i*th class of the *j*th variables in study. Odds Ratio (OR) was used as a measure of association between the variable in study and the positive cases of *Salmonella*, and confidence intervals at 95% were estimated for each OR estimators. OR and CI95% estimators were generated of utilising a multiple logistic regression model which included as response variable suggestive/non-suggestive of *Salmonella* cases and as regression variables sex, age, breed size, body condition in addition to all possible interactions. When some interactions of component in the complete model resulted non-significant ( $P>0.05$ ), it was eliminated. To use the reduced model and to define the best variables ( $P<0.05$ ) in the final model, stepwise method was specified as model options statement from LOGISTIC Procedure of SAS 9.4.

## RESULTS AND DISCUSSION

During this study, a prevalence of 6.27% (24/385) *Salmonella* spp. was detected in stray dogs. In a previous study conducted at the border with Mexico and the United States (US), a prevalence of 9.2% (33/358) in stray dogs (Jay-Rusell *et al* 2014) was detected. Regarding other studies in the world, a prevalence of 43.7% was found in dogs in Nigeria ([Jajere et al 2014](#)) and in the United Kingdom it was 0.23% ([Lowden et al 2015](#)).

The analysis of the variables to determine the association of factors in cases of *Salmonella* spp. did not show significance (sex, size, body condition and bred size). Meanwhile, a significant difference ( $P<0.05$ ) was found for the age variable ([Table 1](#)), observing that dogs under one year are three times more likely to acquire *Salmonella* with respect to dogs older than one year ([Table 2](#)); the multiple logistic regression model constructed to control the confusion, calculating the adjusted ORs by sex, age, body condition and bred size ([Table 3](#)) showed a statistically significant association ( $P=0.003$ ) with the age factor. *Salmonella* infection at an early age in dogs may be easier due to the low resistance of the immune system, although previous studies show that the

prevalence in dogs is higher than in puppies. This can be explained by providing an environment and conditions of adequate health or even the protection of antibodies transmitted by the mother ([Jajere et al 2014](#)).

**Table 1** Descriptive epidemiological results; results by isolate.



ID	Sex	Age	Breed	Body condition	C/Z	API 20E	Sequencing analysis	Blast access
120	F	>1	S	B	U	<i>Salmonella</i> spp. (99.9%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY858926.1
184	M	>1	M	R	U	<i>Salmonella</i> spp. (85.2%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY973639.1
208	M	>1	L	R	CA	<i>Salmonella</i> spp. (99.9%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY908469.1
267	F	<1	M	R	CA	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY973639.1
268	M	<1	S	G	CA	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	EF489442.1
296	F	>1	S	R	U	<i>Salmonella</i> spp. (*%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY908469.1
298	M	<1	M	R	U	<i>Salmonella</i> spp. (99.9%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY858926.1
317	M	<1	M	R	U	<i>Salmonella</i> spp. (77.1%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	MF372544.1
335	M	<1	S	B	R	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	MF772485.1
338	F	>1	M	G	R	<i>Salmonella</i> spp. (99.9%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	JQ694188.1
349	M	<1	M	R	R	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	MF372544.1
352	F	<1	S	G	U	<i>Salmonella</i> spp. (99.9%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	EF489442.1
354	M	<1	S	G	U	<i>S. Choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (99.7%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	MH196340.1
375	F	>1	M	G	U	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	NR_116125.1
383	F	<1	M	G	U	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	MH196335.1
387	M	<1	S	G	U	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY858926.1
396	F	>1	M	B	U	<i>Salmonella</i> spp. (83.6%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY858926.1
398	M	>1	L	R	U	<i>Salmonella</i> spp. (92.8%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	MH041189.1
399	M	>1	S	R	U	<i>Salmonella</i> spp. (99.9%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	CP020912.1
411	F	<1	M	G	U	<i>S. Choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (99.7%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	NR_116125.1
437	M	<1	L	G	U	<i>Salmonella</i> spp. (99.9%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	EF489442.1
454	F	>1	S	G	U	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	KY776580.1
488	F	<1	L	G	U	<i>Salmonella</i> spp. (89.0%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	MH196340.1
501	M	<1	M	R	U	<i>S. Choleraesuis</i> ssp <i>arizonae</i> (99.7%)	<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i>	NR_116125.1

\*Sex: Female (F), Male (M).

\*Age: <1 (younger than one year of age), >1 (older than one year of age).

\*Size: Small (S), Medium (M), Large (L).

\*Body condition: Good (G), Regular (R), Bad (B).

\*Capture Zone (C/Z): urban (U), rural (R), and coastal area (CA).

**Table 2** Prevalence by age and association between age with *Salmonella*+

Groups	<i>Salmonella</i> +	<i>Salmonella</i> -	<i>P</i> <sup>1</sup>	OR (CI. 95%)
Younger than 1 yr	12.15% (13/107)	94	< 0.05	3.07 (1.35, 6.96)
Older than 1 yr	4.32% (12/278)	266		
Total	25	360		

<sup>1</sup>Chi-square.**Table 3** Multiple Logistic Regression Analysis.

Groups	Estimate	SE	P	OR (CI. 95% OR)
Intercept	0.628	1.205	0.602	
Sex	0.282	0.426	0.509	1.325 (0.574, 3.059)
Age	1.282	0.434	0.003	3.605 (1.538, 8.453)
Bred size	0.415	0.318	0.192	1.514 (0.811, 2.828)
Body condition	-0.555	0.297	0.062	0.574 (0.320, 1.029)

SE: Standard error, *P*: statistical significance by Chi-square.

The samples obtained in the present study were categorized to subspecies (*S. enterica* subspecies *enterica* and *S. enterica* subspecies *arizonae*), as in the study by Jay-Rusell (2014). The present study exclusively used sequencing as a standard test and only a coincidence-relation of 99.9% was accepted when comparing them in Blast N (NCBI/BLAST). Positive culture samples suggestive of *Salmonella* spp. (n=24) were characterised using the API 20E. Additionally, sequencing was performed for *Salmonella* positive culture samples, obtaining a proportion of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* of 87.5% (21/24) and a lower proportion of *S. enterica* subspecies *arizonae* at 12.5% (3/24).

The region of northwest Mexico where this study was performed presents a large number of stray dogs with free access to feed and defecation in any conurbated area. This promotes the spread of the pathogen and the infection of places frequented by other animals as well as people. The constant growth of the canine population in the streets is among the main factors that have exacerbated the

problem of zoonotic diseases in northwest Mexico ([Tinoco-Gracia et al 2007](#), [Trasviña-Muñoz et al 2017](#)).

## REFERENCES:

Andino A, Hanning I. 2015. *Salmonella* enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *Scientific World Journal* 2015, 520179. [ [Links](#) ]

Ayuntamiento de Mexicali, México. 2009. Reglamento para el control de los animales domésticos del municipio de Mexicali, Baja California. *Periódico Oficial del Estado de Baja California*, Mexicali, Mexico. [ [Links](#) ]

Ayuntamiento de Mexicali, México. 2009. Reglamento para el control de los animales domésticos del municipio de Mexicali, Baja California. *Periódico Oficial del Estado de Baja California*, Mexicali, Mexico. [ [Links](#) ]

Flores-Ibarra M, Estrella-Valenzuela G. 2004. Canine ecology and socioeconomic factors associated with dogs unvaccinated against rabies in a Mexican city across the US-Mexico border. *Prev Vet Med* 62, 79-87. [ [Links](#) ]

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

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2015. *Censos y conteos de población y vivienda. Encuesta intercensal. Poblacion total. México*. INEGI: México. [ [Links](#) ]

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2015. *Encuesta intercensal. Informacion por entidad. Baja California*. INEGI: México. [ [Links](#) ]

Jajere SM, Onyilokwu SA, Adamu NB, Atsanda NN, Saidu AS, *et al.* 2014. Prevalence of *Salmonella* infection in dogs in Maiduguri, northeastern Nigeria. *Int J Microbiol* 2014, 392-548. [ [Links](#) ]

Jay-Russell MT, Hake AF, Bengson Y, Thiptara A, Nguyen T. 2014. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from stray dog and coyote feces in a major leafy greens production region at the United States-Mexico Border. *PLOS ONE* 9, e113433. [ [Links](#) ]

Kiflu B, Alemayehu H, Abdurahaman M, Negash Y, Eguale T. 2017. *Salmonella* serotypes and their antimicrobial susceptibility in apparently healthy dogs in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Vet Res* 13, 134. [ [Links](#) ]

Lowden P, Wallis C, Gee N, Hilton A. 2015. Investigating the prevalence of *Salmonella* in dogs within the Midlands region of the United Kingdom. *BMC Vet Res* 11, 239. [ [Links](#) ]

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, *et al.* 2010. International collaboration on enteric disease 'Burden of Illness' studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50, 882-889. [ [Links](#) ]

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2016. Salmonellosis. En: OIE (ed). *Manual Terrestre*. OIE: Paris, Francia. [ [Links](#) ]

Rodicio MR, Mendoza MC. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infec Micr Cl* 22, 238-245. [ [Links](#) ]

Seepersadsingh N, Adesiyun AA, Seebaransingh R. 2004. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. in Non-diarrhoeic dogs in Trinidad. *J Vet Med B* 51, 305-355. [ [Links](#) ]

SSA, Secretaría de Salud y Asistencia. 2014. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: México. N° 53, vol. 31, semana 53, 2015.

[ [Links](#) ]

SSA, Secretaría de Salud y Asistencia. 2015. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: México. N° 52, vol. 32, semana 5, 2016.

[ [Links](#) ]

SSA, Secretaría de Salud y Asistencia. 2016. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: México. N° 52, vol. 33, semana 52, 2016.

[ [Links](#) ]

SSA, Secretaría de Salud y Asistencia. 2017. Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: México. N° 52, vol. 34, semana 52, 2017.

[ [Links](#) ]

Thrusfield M. 2007. Surveys. In: *Veterinary Epidemiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Science: Iowa, USA, Pp. 233. [ [Links](#) ]

Tinoco-Gracia L, Barreras-Serrano A, López-Valencia G, Tamayo-Sosa AR. 2007. Seroprevalence and risk factors associated with larva migrans of *Toxocara canis* in dogs from Mexicali Baja California, Mexico. *J Anim Vet Adv* 6, 198-202. [ [Links](#) ]

Trasviña-Muñoz E, López-Valencia G, Alvarez Centeno P, Cueto-González SA, Monge-Navarro FJ, *et al.* 2017. Prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the northwest area of Mexico. *Austral J Vet Sci* 49, 105-111.

[ [Links](#) ]

**Prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the northwest area of Mexico**

Enrique Trasviña-Muñoz, Gilberto López-Valencia\*, Pedro Álvarez Centenob, Sergio A. Cueto-González, Francisco J. Monge-Navarro, Luis Tinoco-Gracia, Karla Núñez-Castro, Paulina Pérez-Ortiza, Gerardo E. Medina-Basulto, Alma R. Tamayo-Sosaa, Daniel Gómez-Gómez

**ABSTRACT.** Zoonotic parasitic infections are a major global public and veterinary health problem and widespread among stray dogs. The objective of this study was to establish the prevalence of intestinal parasites in stray dogs in the urban, rural and coastal areas of Mexicali County in northwest Mexico. In 2014, from January to December, 380 stray dogs were captured. The entire small intestine, cecum and faeces samples were collected and examined by using simple zinc sulfate flotation and Lugol's solution staining. Data were statistically analysed. Overall, about 21.5% of examined dogs were found positive for intestinal parasites. *Toxocara canis* was the most frequent detected parasite, with a prevalence of 7.1%, followed by *Toxascaris leonina* (5.5%), *Cystoisospora* sp. (5.0%), *Taenia* sp. (3.9%) and *Dipylidium caninum* (2.8%). Dogs were more frequently found to be infected with a single genus of intestinal parasite (18.7%) than co-infected (2.8%). Intestinal parasites were more prevalent in samples from the coastal area (25%) than in those from the rural (24.4%) and urban (20.6%) areas, however, only statistical association was found between capture area and specific intestinal parasitic infection. There were significant differences in the prevalence of taeniasis among two age groups ( $P < 0.01$ ). A seasonal peak of prevalence for intestinal parasitic infections was found during spring ( $P < 0.05$ ), corresponding with a seasonal peak of prevalence of *T. canis* ( $P < 0.05$ ). The wide range of isolated parasites indicated that people residing in this area are at risk of exposure to these potentially hazardous zoonotic pathogens.

Key words: toxocariasis, taeniasis, Mexico, public health.

RESUMEN. Las infecciones zoonóticas parasitarias son un problema global público y para la medicina veterinaria, siendo diseminadas por perros callejeros. El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de parasitosis intestinales en perros callejeros de la zona urbana, rural y costera del municipio de Mexicali, noroeste de México. En 2014, entre enero y diciembre, se capturaron 380 perros. Se colectó el intestino, ciego y heces y se examinaron utilizando flotación con sulfato de zinc y tinción con la solución de Lugol. Los datos fueron analizados estadísticamente. En general, alrededor del 21,5% de los perros examinados fueron positivos a parásitos intestinales. *Toxocara canis* fue el parásito más frecuentemente, con una prevalencia del 7,1%, seguido por *Toxascaris leonina* (5,5%), *Cystoisospora* spp. (5,0%), *Taenia* spp. (3,9%) y *Dipylidium caninum* (2,8%). Los perros fueron más frecuentemente encontrados infectados con un solo género de parásito intestinal (18,7%) que coinfectados (2,8%). Las parasitosis intestinales fueron más prevalentes en muestras de la costa (25%) que del área rural (24,4%) y urbana (20,6%), sin embargo, solo se encontró asociación estadística entre el área de captura y las parasitosis intestinales específicas. Hubo diferencias significativas en la prevalencia de taeniasis entre los dos grupos de edad ( $P < 0,01$ ). El pico estacional de la prevalencia de infecciones parasitarias intestinales se encontró durante la primavera ( $P < 0,05$ ), correspondiendo con el pico estacional de *T. canis* ( $P < 0,05$ ). La amplia gama de parásitos aislados indicó que las personas que residen en esta zona están en riesgo de exposición a estos patógenos zoonóticos potencialmente peligrosos.

Palabras clave: toxocariasis, teniasis, México, salud pública.

## INTRODUCTION

Since humans began to live in close proximity to companion animals, zoonotic diseases have become a major problem for human health (Day et al 2012). Dogs can harbor a wide range of intestinal parasites, some of which have a zoonotic potential, such as *Toxocara canis*, *Dipylidium caninum* and *Taenia multiceps*

(Weese et al 2011). Human parasitic infections typically occur following ingestion of infective eggs from contaminated water or soil, ingestion of infected meat from the cattle or ingestion of inadequately washed or cooked fruits and vegetables (Lee et al 2010). Public concern over canine parasitic diseases has been aggravated by the high and uncontrolled number of stray dogs in urban areas that shed parasite eggs and oocysts, representing a source of infection for humans (Traub et al 2005, Martínez- Barbabosa et al 2008). Furthermore, dogs infected with *Taenia* species, can also infect livestock leading to the development of cysts in their tissues and being the cause of monetary losses due to the confiscation of infected carcasses in abattoirs (Wondimu et al 2011).

In previous studies conducted in the municipality of Mexicali in northwest Mexico, the overall prevalence of parasitic diseases in stray dogs was 66% (Luna et al 1981). In 2007, another report showed a 56.1% serologic prevalence of toxocariasis in domestic dogs (Tinoco- Gracia et al 2007a ) and contamination with *Toxocara canis* eggs in 62.5% of soil samples collected from public parks and playgrounds where the presence of domestic and stray dogs was common and frequent (Tinoco-Gracia et al 2007b ). Since then, there are no other reports to follow up the prevalence of parasitic diseases in stray dogs from Mexicali. During 2014, the Municipal Animal Control Center (CEMCA) reported a total of 14,368 dogs captured. To control and reduce the prevalence rate of zoonotic parasitic infections, comprehensive data about their epidemiological features are required. Therefore, the present investigation evaluated the prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the different areas of Mexicali, with special attention to potential zoonotic parasites.

## MATERIAL AND METHODS

### ETHICS STATEMENT

All animal handling procedures were conducted following national code NOM-033-ZOO-1995 and the local regulation for the control of domestic animals (Ayuntamiento de Mexicali 2009). All procedures were also approved by the



Institutional Committee for Animal Ethics, represented by the Academic Group of Animal Health and the Academic Group for Diagnosis of Infectious Diseases, both part of the Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV), Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

## DATA COLLECTION

Sex (male and female), dental age (younger and older than one year of age), size (small, medium and large dogs) and capture zone (urban, rural and coastal area from the municipality of Mexicali) were recorded at the time of sample collection and were used to establish associations with parasitic infections.

## SAMPLE SIZE DETERMINATION

Sample size was determined using the formula described by Thrusfield (2007), with a 95% confidence interval. The expected prevalence of intestinal parasitic infections in dogs from Mexicali was 66% (Luna 1981).

$$n = 1.96^2 \times p(1-p)/d^2$$

Where:

n = required sample size

p = expected prevalence 66%

d = desired absolute precision 5%

The minimum sample size was 344, but the final sample size was established at 380.

## SAMPLE COLLECTION AND PARASITOLOGICAL PROCEDURES

A cross-sectional, epidemiological study was conducted in the Mexicali County from January to December 2014. The city of Mexicali is situated along the state's northern border with California and is the northernmost city in Latin America; it is located at latitude 32°37'40" N and longitude 115°27'16" W. In order to detect and

identify intestinal parasites directly into the small intestine, cecum and faeces were collected from stray dogs captured by the CEMCA from three areas of the Mexicali municipality: (1) the urban area of the city of Mexicali City, (2) the rural area of the Mexicali Valley and (3) the coast area of San Felipe in the Sea of Cortez. An average of 32 dogs were randomly selected per month and location with a total of 380 dogs sampled. After the personnel from CEMCA had euthanised the dogs following their approved procedure, dog carcasses were dissected to remove the small intestine and cecum. Stool samples were taken directly from the rectum. Small intestine, cecum and stool samples were placed in plastic bags, identified, stored at 4 °C and sent to the Laboratory of Parasitology in IICV and analysed for the detection and identification of intestinal parasites. To detect and identify intestinal parasites, the small intestine and cecum were opened longitudinally for examination. Faecal samples were examined for eggs and oocysts by zinc sulfate flotation technique (specific gravity 1.250), and lugol's iodine was added to help in the identification of protozoan cysts and coccidial oocysts (Besné et al 2005). Helminths were detected in intestines and feces, however some tapeworms were not detected in faeces but they were detected in the intestine, for this reason eggs per gram (EPG) are not presented and protozoa were identified in stool. Morphological identification of adult parasites, eggs and oocysts were performed as described by Zajac et al (2012).

## STATISTICAL ANALYSIS

Descriptive statistics indicators were calculated to establish the frequencies of the overall cases of parasitic intestinal infections, for each specific parasite, for single infected and co-infected samples, for capture zone and seasonal trend of parasitic infections. Inferential analysis were performed using Statistix 9® software, Chi square ( $\chi^2$ ) estimation were performed to establish associations between parasitic infections and analysed variables, odds ratio (OR) were also calculated with 95% confidence intervals.

## RESULTS

Out of 380 faecal samples analysed for the presence of intestinal parasites, 82 (21.5%) were positive for at least one parasitic species. The prevalence of intestinal parasitic infections was 18.7% (71 of 380), being *T. canis* the most frequent parasite observed in this group of animals. In contrast, 2.8% (11 of 380 samples) of dogs were infected by at least two different species of parasites, being *T. canis* and *T. leonina* the most frequent observed co-infection (table 1). The overall prevalence of protozoa and helminths was 5% (19 of 380) and 17.1% (65 of 380), respectively. *T. canis* was the most common helminth (7.1%), followed by *T. leonina* (5.5%), *Taenia* sp. (3.9%) and *Dypilidium caninum* (2.9%). Based on capture area of the dogs, the largest frequency of infection with intestinal parasites was found in the coastal area of San Felipe, with an overall prevalence of 25%. In contrast, the lowest frequency was detected in the urban area of the city of Mexicali, with a prevalence of 20.6% (table 2). However, no significant differences were found between the three different areas and overall prevalence, but statistical association was found between capture area and specific intestinal parasitic infection, as demonstrated by the presence of *Cystoisospora* sp. only in the urban area ( $P<0.05$ ). Taeniasis showed a higher prevalence in the rural area (14.2%) compared with the urban (2.7%) and coastal areas (0%) ( $P<0.001$ ), with an OR of 5.8 (table 3). In contrast, the coastal area of San Felipe was characterised by a high prevalence of dypilidiasis (20%) ( $P<0.001$ ), as well as a high risk of infection with an OR of 72.5 (table 4). Concerning seasonal trend, only *T. canis* showed a higher occurrence (16.2%) during spring season ( $P<0.001$ ) (table 5). The overall seasonal prevalence of parasitic infections was higher in spring (27.5%) than in summer season (15.4%), with an odds ratio of 2.0, indicating twice the risk of parasitic infections during this season (table 6). No significant differences were found between intestinal parasitic infections and sex and size of dogs. However the variable age showed a significant difference for *Taenia* sp. ( $P<0.01$ ) indicating higher prevalence in dogs older (5.7%) than one year (0%) (table 7).

Table 1 . Samples detected with one or two genera of parasites.

Detected parasites	Positives/analysed	Prevalence
<b>Single infection</b>		
Toxocara canis	19/380	5.0%
Toxascaris leonina	12/380	3.1%
Cystoisospora spp.	17/380	4.4%
Taenia spp.	13/380	3.4%
Dipylidium caninum	10/380	2.6%
Subtotal	71/380	18.7%
<b>Co-infection</b>		
Toxocara canis + Toxascaris leonina	6/380	1.5%
Toxocara canis + Taenia spp.	2/380	0.5%
<i>Toxascaris leonina + Cystoisospora canis</i>	2/380	0.5%
Dipylidium caninum + Toxascaris leonina	1/380	0.2%
Subtotal	11/380	2.8%
<b>Total</b>	<b>82/380</b>	<b>21.5%</b>

Table 2 . Prevalence by capture zone.

Total (n=380)	Mexicali City (n=291) (%)	Mexicali Valley (n=49) (%)	San Felipe Seaport (n=40) (%)	P
Toxocara canis	7.5	6.1	5	0.80
Toxascaris leonina	6.1	4.0	2.5	0.56
Cystoisospora spp.	6.5	0	0	0.047*
Taenia spp.	2.7	14.2	0	0.0003***
Dipylidium caninum	0.3	4.0	20	0.0000***
Overall prevalence	20.6	24.4	25	0.71

Comparison of overall and specific prevalences by capture zone. Results of  $\chi^2$  test.

\* $P < 0.05$ .

\*\* $P < 0.01$ .

\*\*\* $P < 0.001$ .

Table 3 . Magnitude of association between taeniasis and capture zone.

Capture zone	Taenia +	Taenia –	Total	OR	95% IC	P
Mexicali City	8	283	291	1.0	Reference	–
Mexicali Valley	7	42	49	5.8	2.0-17.1	0.0003***
San Felipe	0	40	40	ND	ND	
Total	15	365	380			

Comparison of capture zone by taeniasis cases. Results of  $\chi^2$  test and odds ratio estimated with confidence intervals (IC) of 95%.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ .

Table 4 . Magnitude of association between dipylidiasis and capture zone.

Capture zone	Dipylidium +	Dipylidium –	Total	OR	95% IC	P
Mexicali City	1	290	291	1.0	Reference	–
Mexicali Valley	2	47	49	12.3	(1.0-138.8)	0.0096***
San Felipe	8	32	40	72.5	(8.7-598.4)	0.0000***
Total	11	369	380			

Comparison of capture zone by dipylidiasis cases. Results of  $\chi^2$  test and odds ratio estimated with confidence intervals (IC) of 95%.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ .

Table 5. Prevalence by season of the year.

Total (n=380)	Spring (n= 80) (%)	Summer (n=110) (%)	Autumn (n=126) (%)	Winter (n=64) (%)	P
Toxocara canis	16.2	6.3	0.7	9.3	0.0004***
Toxascaris leonina	7.5	1.8	8.7	3.1	0.08
Cystoisospora spp.	8.7	1.8	6.3	3.1	0.12
Taenia spp.	2.5	1.8	3.9	9.3	0.08
Dipylidium caninum	0	3.6	5.5	0	0.053
Overall prevalence	27.5	15.4	24.6	18.7	0.16

Comparison of overall and specific prevalences by season of the year. Results of  $\chi^2$  test.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ .

Table 6 . Magnitude of association between season and overall prevalence.

Season	Parasitized	Not parasitized	Total	OR	95% IC	P
Summer	17	93	110	1.0	Reference	–
Autumn	31	95	126	1.7	(0.9-3.4)	0.08
Winter	12	52	64	1.2	(0.5-2.8)	0.57
Spring	22	58	80	2.0	(1.0-4.2)	0.04*
Total	82	298	380			

Comparison of the season of the year by the overall prevalence. Results of  $\chi^2$  test and odds ratio estimated with confidence intervals (IC) of 95%.

\* $P < 0.05$

\*\* $P < 0.01$

\*\*\* $P < 0.001$

Table 7 . Prevalence by age.

Total (n=380)	Younger than 1 yr (n=117) (%)	Older than 1 yr (n=263) (%)	P
<i>Toxocara canis</i>	4.2	8.3	0.15
<i>Toxascaris leonina</i>	4.2	6.0	0.47
<i>Cystoisospora</i> spp.	5.9	4.5	0.55
<i>Taenia</i> spp.	0	5.7	0.0084**
<i>Dipylidium caninum</i>	1.7	3.4	0.35
Overall prevalence	16.2	23.9	0.09

Comparison of overall and specific prevalences by age. Results of  $\chi^2$  test.

\* $P < 0.05$ .

\*\* $P < 0.01$ .

\*\*\* $P < 0.001$ .

## DISCUSSION

The overall prevalence of intestinal parasitic infections found in this study was 21.5%. Previous studies conducted in Mexico showed some differences in the prevalence of intestinal parasites, such as a prevalence of 78% in stray dogs from Queretaro District (Fernández and Cantó 2002). Furthermore, other countries found higher prevalence of intestinal parasitic infections compared with this study. A study conducted in Spain reported an overall prevalence of 71.3%; while prevalences of 86.8%, 58.5%, 43 to 57.4% and 39.2% were found respectively in Ethiopia, Brazil, Italy and Japan (Martínez-Moreno et al 2007, Katagiri and Oliveira 2008, Paulos et al 2012, Kimura et al 2013, Zanzani et al 2014). These differences could be due to the fact that most of the geographic location of Mexicali has a desert climate where temperatures during late spring, summer and early autumn vary from 36 °C to 50 °C with low humidity (Servicio Meteorológico Nacional 2010). In addition to high temperatures, these climate conditions lead to a moisture deficit which may slow or even suppress the development of parasite eggs resulting in lower rate of viability (table 7), making it difficult for parasites to develop and survive in those extreme environmental conditions to produce infection (Polley and Thompson 2009). The most frequently detected parasite in the positive samples (n=82) was *T. canis* with 7.1% of all cases. It has been documented that *T. canis* eggs are very resistant to extreme weather conditions and chemical agents (TrilloAltamirano et al 2003). *T. canis* also was more prevalent during the spring

season when the soils are less dry due the climate in that season, having more chances to survive (Treonis and Wall 2005). Additionally, *T. canis* has different routes of infection, such as oral, transplacental, transmammary, and is well known that it can be transmitted by paratenic hosts, which facilitate the perpetuation of that parasite in the ecosystem (Díez-Baños et al 1999). The prevalence of *T. canis* found in this study was similar to that reported in a previous study conducted in the State of Yucatan, southeast Mexico, with an overall prevalence of 7.7% (Rodríguez-Vivas et al 2001), but lower than that reported in Queretaro, in the central part of Mexico with a prevalence of 13.9% (Fernández and Cantó 2002), the Distrito Federal, Mexico's national capital city with a prevalence of 14% (Núñez et al 2009) and Campeche, also in southeast Mexico with a prevalence of 14.4% (Encalada-Mena et al 2011). *Cystoisospora* spp. was found only in the urban area of Mexicali. This parasite does not represent a zoonotic risk but it is important for dogs because it can damage the intestinal epithelium, causing liquid diarrhea with or without blood, dehydration, weight loss, vomiting, lethargy and anorexia (Miró-Corrales et al 1999). Another important finding in our study was the detection of *D. caninum* in 2.8% of cases. The prevalence of this parasite was higher than that reported in Yucatán (Rodríguez-Vivas et al 2001) but lower than in Queretaro (Fernández and Cantó 2002). Dipylidiasis is an important problem for public health, because it can infect young children causing a variety of gastrointestinal disorders (Neafie and Marty 1993). The prevalence of *Taenia* spp. established in 3.9% in this study, was lower than the 5.4% reported in Queretaro (Fernández and Cantó 2002). The presence of *Taenia* spp. transmitted by dogs is important for public health. Larval stages of *Taenia serialis* and *T. multiceps* (King 2005) can form unilocular cysts in the central nervous system, eye, subcutaneous tissue and muscle tissue (Ing et al 1998). In this study we have identified an association ( $P < 0.05$ ) between the cases of taeniasis and the capture zone (rural area of Mexicali). A possible explanation for this, is that the rural area of the Mexicali County is a zone characterised by poor sanitary conditions, where dogs lives in close contact with livestock, rodents and lagomorphs, animal species known to harbor *Taenia* spp. serving as intermediary hosts to complete their life cycle



(Weese et al 2011). This finding is particularly important because in the rural area of the Mexicali County many large feedlot operations take place, with over 300,000 heads of cattle being fattened each year to send selected meat cuts to local and international markets (SEFOA, 2016), which can be at risk of being infected by contamination of food or water supplies with *Taenia* spp eggs carried by dogs. For example, infection with *Taenia hydatigena* transmitted by dogs can lead to the development of cysts in tissues of the cattle and being the cause of organs, meat or carcass confiscation or condemnation during sanitary inspection at abattoirs, causing monetary losses to producers. (Wondimu et al 2011). No significant differences were detected between parasitic infections and the variables of sex and size of dogs, however, an association ( $P < 0.05$ ) was identified between dogs  $> 1$  year and taeniasis. The cause for this might be that adult dogs move farther distances for feeding and breeding, giving them great chance to get in contact with material contaminated with eggs or get infected after hunting and feeding from rodents or lagomorphs infected with larval stages of *Taenia* spp. (Ajlouni et al 1984). Dipylidiasis was found associated ( $P < 0.05$ ) with presence only in the coastal area of San Felipe, over 100 miles away from urban and rural areas of the municipality and where the mild and more humid climate conditions are more favorable, and intermediary hosts such as the fleas *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felix*, *Pulex irritans* and the louse *Trichodectes canis*, can develop and survive to complete the biological cycle of *D. caninum* (Sánchez-Acedo et al 1999). Considering the public health implications of dipylidiasis, it is necessary to conduct an epidemiological study in this area to identify and evaluate the impact of the intermediary host for dipylidiasis. According to the results of this study, it is concluded that one in five stray dogs carried at least one type of intestinal parasite. *Toxocara canis* was the most common parasite found in single infected cases (19/380) and co-infected cases (8/380). Additionally, parasites of importance to public health were identified such as *T. canis*, *T. leonina*, *D. caninum* and *Taenia* spp. *Toxocara canis* was the most frequent parasite detected, which implies a higher risk to the population. Further studies are needed on the impact on the population of Mexico. The rural area of the Mexicali valley is the region with

higher risk for taeniasis infections mainly because of the large number of stray dogs living in close proximity with cattle management systems. Infection with *Taenia* spp. in carcasses during post-mortem inspection is difficult to achieve, suggesting that an undetermined number of carcasses pass the screening as being free of parasites and the meat is distributed and consumed in both domestic and international wholesale markets, thus increasing the risk of zoonotic transmission of *Taenia* spp through infected meat. The low level of sensitivity inherent to the sanitary post-mortem examination (Abuiser et al 2006), along with the lower rates of detection and official reporting of this type of parasite at local slaughterhouses and TIF abattoirs, generate an area of opportunity for the introduction and instrumentation of preventive medicine strategies in dogs and cattle that allows to reduce the risk of transmission to the human. To control and reduce the problem of zoonotic intestinal parasitic infections both public and veterinary health services should work together, and animal ownership laws should be implemented in Mexico with severe fines for people who do not comply with them, in order to reduce the problem of stray dogs and intestinal parasitic zoonoses.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of the requisites to obtain the grade of Doctor en Ciencias Agropecuarias of the present first author (Universidad Autónoma de Baja California). We thank the Animal Control Municipal Centre of Mexicali and students Priscila Nataly Ríos López and Rocío Yazmín Cazares from the Autonomous University of Baja California for their collaboration in this work.