



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias - Programa de Magíster en Ciencias Veterinarias
con mención en Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal



**Caracterización fenotípica y genotípica de la
multirresistencia antimicrobiana en serovares de
*Salmonella enterica***

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Veterinarias con
Mención en Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal.

ALEX HERNÁN ESPINOZA YARRÁ
CHILLÁN-CHILE
2017

Profesor Guía: Juana López Martín
Dpto. de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Caracterización fenotípica y genotípica de la multirresistencia antimicrobiana en serovares de *Salmonella enterica*

Aprobado por:

Juana López Martín
Médico Veterinario, Mg.Sc.

Profesora Guía

Pedro Rojas García
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.



Evaluador Interno

Pedro Aqueveque Muñoz
Licenciado en Educación, Dr.

Evaluador Interno

Mario Briones Luengo
Médico Veterinario, Mg.Cs.

Director (s) de Programa

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO	PÁGINA
I. Índice de tablas.....	iv
II. Índice de Figuras.....	v
III. RESUMEN.....	vi
IV. SUMMARY.....	vii
V. INTRODUCCIÓN.....	1
VI HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
VII. MATERIALES Y MÉTODO	16
VIII. RESULTADOS.....	21
IX. DISCUSIÓN.....	34
X. CONCLUSIONES.....	48
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	65



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	PÁGINA
EN EL TEXTO	
1. Agentes antimicrobianos y su mecanismo de acción.....	8
2. Serovares de <i>Salmonella enterica</i> y origen de aislado.....	16
3. Concentraciones utilizadas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en los aislados de <i>Salmonella enterica</i>	17
4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en ensayos de PCR convencional para la identificación de la resistencia antimicrobiana en serovares de <i>Salmonella enterica</i>	19
5. Porcentaje de serovares de <i>Salmonella</i> resistentes (Método Kirby Bauer) según origen de aislamiento	21
6. Distribución de cepas de <i>S. enterica</i> con resistencia a algún antibiótico según serovar y origen de aislamiento de acuerdo a método Kirby Bauer.....	21-22
7. Número y porcentaje de serovares de <i>S. enterica</i> con MRA en relación a su origen de aislamiento.....	23
8. Patrones de resistencia a múltiples antimicrobianos en serovares de <i>Salmonella</i> aislados (Método Kirby Bauer).....	24
9. Rango intercuantil y CMI 50 y 90 por el método de Macrodilución (n=33).....	26
10 Distribución de CMI y Resistencia (%) en <i>Salmonella enterica</i> (n=33) desde animales.....	28
11 Número y porcentaje de serovares de <i>S. enterica</i> con MRA en relación a su origen de aislamiento.....	29
12 Patrones de genes de resistencia a múltiples antimicrobianos en serovares de <i>Salmonella</i> aislados.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PÁGINA
EN EL TEXTO	
1. Número de serovares de <i>Salmonella</i> distribuidas según patrones de resistencia observados.....	23
2. Relación entre susceptibilidad antibiótica y origen de las serovares de <i>Salmonella</i>	27
3. Número de serovares de <i>Salmonella</i> distribuidas según patrones de resistencia mediante amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
4. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>Bla_{CMY-2}</i>	30
5. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>sul-1</i>	31
6. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>Bla_{tem-1}</i>	31
7. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>Aph(3)IIa</i>	32
8. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>qnrD</i>	32
9. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>Tet-A</i>	33

I. RESUMEN

Caracterización fenotípica y genotípica de la multirresistencia antimicrobiana en *Salmonella enterica*

Characterization phenotypic and genotypic antimicrobial multi-resistance in serovar of *Salmonella enterica*.

El uso de antimicrobianos representa la herramienta terapéutica mayormente utilizada en el tratamiento de procesos infecciosos de origen bacteriano. Sin embargo, la aparición, desarrollo y propagación constante de agentes patógenos resistentes a los antimicrobianos representa una amenaza grave para la salud, el desarrollo humano y animal. La resistencia antimicrobiana ha generado el fracaso terapéutico y ha complicado el control de enfermedades de origen bacteriano. Por lo tanto, el presente estudio analizó aislados de *Salmonella enterica* de origen animal provenientes del laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Universidad de Concepción. Determinando susceptibilidad frente a 7 antibióticos de frecuente utilización, presentándose resistencia en un 63,64% de las muestras y Resistencia a Múltiples Antimicrobianos (MRA) en un 15,15%. Las muestras presentaron resistencia a sulfadiazina (100%), oxitetracilina (57,58%), amoxicilina (12,12%) y ceftiofur (9,09%) mediante método Kirby-Bauer y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de acuerdo a los protocolos seguidos por las normas del CLSI. La amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) identificó la expresión genotípica de la resistencia principalmente a Sul1 (63,6%), Bla_{tem1} (54,5), Bla_{CMY2} (45,5%), qnrD (21,2%), tet-A (15,2%) y Aph(3)IIa (15,2%). La frecuencia de resistencia encontrada en este estudio y el riesgo que existe de que estas cepas multirresistentes lleguen al hombre a través de la cadena alimentaria sugieren un estudio de seguimiento de este patógeno a fin de establecer un monitoreo de la resistencia a nivel nacional.

Palabras clave: *Salmonella*, Resistencia Antimicrobiana, Concentración Mínima Inhibitoria, Antibiotico

II. SUMMARY

The use of antimicrobials represents the most common therapeutic tool in the treatment of infectious processes of bacterial origin. However, the emergence, development and constant spread of antimicrobial resistant pathogens pose a serious threat to human and animal health. Antimicrobial resistance has generated therapeutic failure and has complicated the control of diseases of bacterial origin. Therefore, the present study analyzed isolated *Salmonella enterica* animal-origin laboratory of Veterinary Microbiology at the University of Concepcion. Determination of susceptibility to 7 frequently used antibiotics, presentation resistance in 63.64% of the samples and Resistance to Multiple Antimicrobials (ARM), 15.15%. The samples showed resistance to sulfadiazine (100%), oxytetraciline (57.58%), amoxicillin (12.12%) and ceftiofur (9.09%) by Kirby-Bauer method and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) according to protocols followed by Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). The amplification of the polymerase chain reaction (PCR) identified the genotype expression of resistance mainly to *Sul1* (63.6%), *Bla_{tem1}* (54.5%), *Bla_{CMY2}* (45.5%), *qnrD* (21, 2%), *tet(A)* (15.2%) and *Aph(3)IIa* (15.2%). The frequency of resistance found in this study and the risk of these multiresistant strains reaching man through the food chain suggest a follow-up study of this pathogen establishing a national resistance monitoring.

III. INTRODUCCIÓN

El uso de antimicrobianos representa la herramienta terapéutica más común en el tratamiento de procesos infecciosos de origen bacteriano. Sin embargo, la aparición, desarrollo y propagación constante de agentes patógenos resistentes a los antimicrobianos representa una amenaza grave para la salud, el desarrollo humano y animal, volviéndose un motivo creciente de preocupación mundial. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017) advierte que si no se reduce este uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, pronto entraremos en una época postantibiótica en la que las enfermedades que ya habíamos erradicado volverán a azotar a la humanidad. La alarma de resistencia antimicrobiana comenzó hace dos décadas (NARMS, 2017; CDC, 2017) durante la conferencia de la Unión Europea en Copenhague desarrollaron las recomendaciones sobre la amenaza microbiana (Copenhague, 1998). Desde entonces se ha tratado de prevenir y mitigar el uso indiscriminado de los antimicrobianos generándose directrices, la primera orientada sobre el uso de antimicrobianos hacia los animales, se discute que hay 30 familias de antimicrobianos que se utilizan en veterinaria que están relacionados con el uso de antimicrobianos para los tratamientos de enfermedades en humanas. Las cepas bacterianas se vuelven resistente a los antimicrobianos, debido a que son capaces de desarrollarse en concentraciones de antimicrobiano que en condiciones normales son letales, por lo tanto su concentración mínima inhibitoria (CMI) está sobre el valor acostumbrado (WHO, 2017). Debido a que se han producido cambios en la ecología de las bacterias, por terapias subdosificadas o interrumpidas con propósito curativo, o de la misma manera con propósitos preventivos y/o estimulantes como en los promotores de crecimiento. La Oficina Internacional de Epizootia (OIE, 2017) concuerda que el desarrollo de microorganismos resistentes originados por la administración de antibióticos a los animales es un riesgo latente. Por lo que han diseñado programas de monitoreo para asistir a los países miembro en el seguimiento de las prácticas con antimicrobianos en animales, con el fin de identificar problemas y aparición de resistencia antimicrobiana. Otra de las causas es a través de residuos farmacológicos en los alimentos de origen animal están en la capacidad de inducir mecanismo de resistencia en bacterias presentes en los

humanos. En Chile desde el año 2006 el uso de antimicrobiano como promotor de crecimiento en animales de abasto se encuentra prohibido, además el Servicio Agrícola y Ganadero cuenta con un sistema de monitoreo frente a residuos farmacológicos en los alimentos de origen animal y en la Unión Europea estas dos causas se encuentran prohibidas. En los últimos seis años el consorcio multidisciplinario RESET han publicado numerosos artículos de investigación con resultados científicos para dar soluciones prácticas y mejorar el diagnóstico, vigilancia y prevención, lo que ha permitido el uso de sus datos para mejorar los conceptos de “Una Salud” para intereses de Salud pública y políticos (reset-verbund, 2017), sus estudios apuntan a la aparición de bacterias intestinales resistentes a los antibióticos, su origen y las vías de transmisión. La principal ruta de traspaso de cepas bacterianas desde los animales a humanos es a través de alimentos de origen animal. Sin embargo, se ha visto que la transferencia horizontal de genes entre bacterias ha generado un aumento en la resistencia antimicrobiana. En Medicina veterinaria es bien conocida la baja eficacia de los tratamientos antimicrobiano frente a la mastitis causada por *Staphylococcus aureus*, que figura como uno de los microorganismos más hábiles productores de β -lactamsas, enzima que inhibe la acción de un gran número de beta-lactámicos. En la industria de los alimentos *S. aureus* y *Salmonella spp.* son unos de los principales patógenos frente a la seguridad e inocuidad alimentaria, es por esta razón que estudios de relación entre estos patógenos suele ser de mayor importancia para su eliminación. Eleni *et al*, (2017) describe la relación de la formación de biopelículas entre *S. aureus* y *S. Typhimurium* en relación a la resistencia de desinfectantes, concluyeron que hubieron cambios significativos frente a las biopelículas entre las comunidades. Both *et al*, (2017) describe la asociación de resistencias a compuestos orgánicos entre *staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium*. Por otra parte, se describen estudios de la importancia de la trasmisión nosocomial para la diseminación de *Salmonella spp* y otros patógenos, por lo que es necesario fomentar sistemas de control de infecciones en estos entornos e implementar programas de control de infecciones en clínicas veterinarias subrayando la eficacia de estos conceptos para proteger tanto a los animales en riesgo y al personal

veterinario Walther *et al*, (2017). Por lo tanto, dentro de las conclusiones de Copenhague “La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos que no puede ser vista como un problema local, ni siquiera nacional, se trata de un problema global que requiere de una estrategia común”.

Generalidades de *Salmonella*

Salmonella pertenece a la clase de las gamma-proteobacterias, en el orden *Enterobacteriales*, y a la familia *Enterobacteriaceae* (Vadillo *et al.*, 2002). La morfología de *Salmonella* es bacilar, de tamaño corto que oscila entre 0,7 - 1,5 μm y 2 - 5 μm . *Salmonella* son bacterias gram negativas, no esporuladas, anaerobias facultativas y oxidasas negativas. Generalmente son bacterias móviles por flagelos peritricos (Goyache and Briones, 2002). Se detallan en el Manual Sistemático Bacteriano de Bergey la descripción bioquímicas de *Salmonella*. Se trata de bacterias que fermenta glucosa, que no son capaces de fermentar lactosa y sacarosa, a raíz de ésta fermentación generan la producción de ácido y gas. Por otra parte, presentan actividad enzimática de catalasa y son capaces de reducir los nitratos a nitritos. Sin embargo, no presentan en su cadena de reacciones citocromo oxidasa.

Salmonella presenta un crecimiento óptimo de 35 a 37 °C de temperatura. Sin embargo, frente a condiciones de temperaturas extremas presenta la capacidad de adaptarse entre un rango de 4 a 54 °C (Vadillo *et al.*, 2002). La capacidad de adaptación al medio, permite a *Salmonella* crecer en ambientes de refrigeración, permitiendo su desarrollo en alimentos almacenados entre los 2 y 4 °C. Por lo tanto, *Salmonella* ha sido identificada como un potencial microorganismo patógeno relacionado a enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) a nivel mundial. El pH óptimo de la proliferación es de 6,5 y 7,5 (Vadillo *et al.*, 2002). Sin embargo, *Salmonella* tiene la capacidad de crecer a pH 4,5 y 9,5 e incluso algunas cepas son capaces de proliferar a pH estomacal. La actividad de agua (a_w) en que se desarrolla *Salmonella* puede estar por debajo de 0,93 (Goyache and Briones, 2002) lo que ha otorgado la capacidad de sobrevivir en productos deshidratados.

En la actualidad se conocen 2500 serovares de *Salmonella*. Debido a esto, la nomenclatura de *Salmonella* ha presentado cambios a través del tiempo. De

acuerdo a la última propuesta de Kauffmann-White (Goyache and Briones, 2002), la Organización Mundial de la Salud y el Laboratorio Pasteur de Francia la especie *Salmonella enterica* se divide en 6 subespecies las cuales recibieron el nombre geográfico de donde fueron primeramente aislado, por lo tanto, *Salmonella enterica* subespecie: enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI). *S. bongori* se considera como subespecie V (Brenner *et al.*, 2000). La subespecie enterica (I) es de importancia epidemiológica y Salud pública, debido a que se describen distintas variantes séricas que contagia e infecta al ser humano o pueden presentar cuadros subclínicos actuando como reservorio.

Cuadro clínico en humanos

La enfermedad causada por *Salmonella* puede ser un cuadro autolimitante que demora en controlar la enfermedad entre los 4 a 7 días sin necesidad de terapia antibiótica (White *et al.*, 2001). Aunque puede ser grave en población de riesgo como en infantes, geriátrico y pacientes inmunodeprimidos. Se ha visto que los serovares tifoideales de *Salmonella enterica* tienen como hospedador específico al ser humano, se caracterizan por presentar un cuadro sistémico con sintomatología de estado febril, dolor abdominal, diarrea, constipación, erupción maculo papular de color rojo salmón en el cuerpo (Haraga *et al.*, 2008). Los serovares no tifoideales como *S. Cholerasuis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* presentan un amplio rango de especies de animales susceptibles caracterizado por presentar un cuadro gastrointestinal incluyendo al humano. Los individuos presentan sintomatología gastroentérica a las 72 horas posterior a la ingestión de alimento o agua contaminada, con una duración de 4 a 7 días. La Salmonelosis puede presentarse desde un fuerte dolor de cabeza hasta síntomas como dolor abdominal, vómito, y diarrea inflamatoria. Sin embargo, las variantes séricas *S. Cholerasuis* en porcino y *S. Dublin* en bovino son especie-específicas, que presentan la particularidad de producir la enfermedad en humanos colocando en riesgo la vida. Los dos serovares más importantes de Salmonelosis transmitida desde los animales al ser humano en la mayor parte del mundo son los pertenecientes a los grupos de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. El diagnóstico es mediante coprocultivo con relación entre el cuadro

sintomatológico con el consumo de alimentos derivados desde carne de ave y/o huevos.

De acuerdo a los últimos datos publicados por Centers for Disease control and Prevention (CDC) del año 2011, anualmente se estima que aproximadamente 1.2 millones de enfermedades y 450 muertes son provocadas por *Salmonella* no tifoideas en Estados Unidos (Scallan *et al.*, 2011). Presentando una incidencia de 15.2 enfermedades por 100.000 individuos (CDC, 2014). A nivel nacional el Instituto de Salud Pública (ISPCH) en el año 2010 confirmó 2.728 casos de salmonelosis agrupándose los mayores casos en la Región Metropolitana, precisamente se destaca un grupo etario entre los 2 a 20 años de edad, correspondiente al sexo masculino que concentró la mayor cantidad de casos en un 18,5% mientras que en mujeres representó el 16,5%. Por otra parte, cabe destacar que entre el 60 y 80% de los casos a nivel mundial no se reconocen como parte de un brote identificado y se clasifican como casos esporádicos o ni siquiera se diagnostican (WHO, 2013).

Reservorio de *Samonella*

Salmonella habita en una amplia distribución de ambientes, mayoritariamente diseminada en la naturaleza y en sistemas gastrointestinales de animales de sangre fría. Sin embargo, *S. enterica* presenta un amplio rango de hospedadores, entre ellos tractos gastrointestinales de distintos mamíferos, reptiles, aves e insectos. Los animales juegan un importante rol en la diseminación de éste microorganismo en el medio ambiente. Además, *Salmonella* se presenta como microbiota en animales de abasto. Condición que permite contaminar la cadena alimentaria, aguas y alimentos. La infección en humanos resulta desde la ingestión de los alimentos contaminados como carnes de aves de corral, de bovino, cerdo, de leche y ovoproductos. La transmisión de *Salmonella* por la cadena alimentaria y las malas prácticas de manipulación están directamente asociadas. De esta manera, genera un impacto en medicina, en salud pública y economía de un país. Otro gran reservorio es el ser humano. La diseminación de cepas multirresistente de acuerdo a CDC, (1982) es por la inadecuada higiene que provoca el transporte de *Salmonella* entre los seres humanos. Por lo tanto, se

describe a *Salmonella* como el principal microorganismo patógeno que se transmite por los alimentos. Aquí la importancia del control y prevención de la enfermedad desarrolla estrategias epidemiológicas para reducir el impacto en la salud pública y los costos asociados a terapias hospitalarias.

Antibióticos en Medicina Veterinaria

En lo que parece un uso normal, la práctica terapéutica de antibióticos en medicina tanto humana como veterinaria, ha permitido la selección de bacterias resistentes, que no sólo pueden infectar al hombre sino también causar la enfermedad. Así también el uso de antibiótico como promotores del crecimiento en animales de abasto puede aumentar la asociación de resistencia antimicrobiana de *Salmonella* aisladas en humanos (Vadillo *et al.*, 2002). Esto trae consecuencias sobre la salud humana como infecciones difíciles de tratar y fracaso del tratamiento terapéutico. Otras causas que conducen a la multirresistencia que presenta *Salmonella* es el uso indiscriminado de antibiótico sin indicación médica; presentaciones nosocomiales colocando al ser humano como el principal diseminador de la enfermedad; alimentos medicados para reducir y prevenir enfermedades en la producción animal. Se postula que la transmisión de *Salmonella* resistente a antibióticos desde los animales hacia el hombre ha sido por el efecto de residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal (Holmberg *et al.*, 1984; Heisig *et al.*, 1995).

Salmonella resistente a los antibióticos presentan un riesgo significativo para la salud pública, debido a que los serovares son altamente patógenos para el hombre. Es por esto que el estudio de la microbiota fecal, es de gran importancia en la vigilancia de la transmisión de microorganismos patógenos para el ser humano. En un intestino sano, otorga características ambientales que confieren estabilidad al control de las poblaciones microbiana. El control está determinado por ciertas características del ambiente intestinal como la disponibilidad de nutrientes, concentración de protones y por el sistema inmunológico del hospedador. La microbiota presente beneficia al hospedador en mantener alerta al sistema inmunológico frente a otras bacterias enteropatógenas, permite la maduración del sistema intestinal y finalmente crea una especie de barrera superficial sobre el

intestino que otorga un mecanismo de defensa al hospedador frente a la colonización de bacterias enteropatógenas como *Salmonella*. El desafío para las bacterias enteropatógenas es lidiar con esta barrera de defensa por parte de la microbiota del hospedador. De esta manera poder colonizar y generar sus mecanismos de sobrevivencia. Barthel *et al.*, (2003) Hapfelmeier *et al.*,(2005) Stecher *et al.*,(2006) describen estudios de antibióticos en ratones, que han aportado una base de datos, respecto a la reducción de la microbiota, describiendo que el repoblamiento demora entre 2 a 3 días, generando una puerta de entrada a las bacterias enteropatógena como *Salmonella*. Como se demuestra en ensayos “Estreptomycin Mouse model” para *S. enterocolitis*, posterior a la administración de estreptomycin, la infección oral con *Salmonella* conduce a una colonización eficaz en el intestino, especialmente en ciego y colon 10^9 UFC/g. Es por esto, que el objetivo de nuevas investigaciones apunta a reducir la terapia antibiótica que alteran la primera barrera de defensa del sistema gastrointestinal permitiendo la entrada de microorganismo resistente a antibióticos.

Actualmente la preocupación de la resistencia a antibióticos se presenta por el grupo de las quinolonas. Dado que las fluoroquinolonas son uno de los antibióticos a elección para el tratamiento de infecciones graves producidas por *Salmonella* en humanos (White *et al.*, 2001). En veterinaria es una práctica habitual el uso de quinolona (enrofloxacin) (Brown, 1996), además de las cefalosporinas de tercera generación (Fàbrega *et al.*, 2013). La resistencia de estos antibióticos altamente efectivas frente a enfermedades gastrointestinales es completamente indeseable por las importantes implicancias clínicas que presenta (Orden Gutiérrez y De La Fuente, 2001; Helms *et al.*, 2002).

Las quinolonas son un grupo bactericida por inhibición de la transcripción y traducción del ADN bacteriano (Adams *et al.*, 1987). Han presentado varias modificaciones en su estructura química para generar variación en sus características lipofílica, en su capacidad de absorción, distribución y eliminación del fármaco. Sin embargo, estas modificaciones no cambian el espectro bacterial, ni potencial del efecto antibactericida (Asuquo and piddock 1993). De acuerdo con Drlica and Zhao (1997) el mecanismo de resistencia frente a fluoroquinolonas es

debido a mutaciones en la codificación de genes de la subunidad A de la ADN girasa (*gyrA*) (Adams *et al.*, 1987). Otro blanco de las fluoroquinolonas es sobre la enzima topoisomerasa IV compuesta por subunidades codificadas por *parC* y *parE*. La actividad enzimática de la ADN girasa permite el desenrollamiento o enrollamiento del ADN. Las topoisomerasas actúan sobre un segmento del ADN, rompiendo ambas hebras. Así las fluoroquinolonas actúan como barrera física para el movimiento de la horquilla de replicación (Tabla 1).

Tabla 1. Agentes antimicrobianos y su mecanismo de acción.

Familia antibiótica	Agente antimicrobiano	Mecanismo de acción
Anfenícoles	Florfenicol	Bloquea la reacción de la peptidiltransferasa en los ribosomas.
B-lactámicos Cefalosporina	Amoxicilina Ceftiofur	Acción bactericida por el ataque sobre el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicanos que componen la pared celular
Tretaciclina	Tretaciclina	Bloquea la unión de los aminoacil-tARN al lugar "a" del ribosoma.
Aminoglucósidos	Gentamicina	Impide la transición desde el complejo de iniciación a la elongación de la cadena por el ribosoma, y provoca errores de descodificación.
Sulfonamidas	Sulfamethozaxole	Actúa como un antimetabolito, interfiriendo con la producción del ácido fólico, en consecuencia la normal producción de ARN, síntesis proteica y los mecanismo de replicación microbianos.
Quinolonas	Enrofloxacino	Inhibe la transcripción del ADN y traducción del ARN _m bacteriano.

El grupo de los anfenícoles está caracterizado por cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol. Las modificaciones en la estructura química de cloranfenicol se basan debido a que generaba anemia aplásica por la presencia de un grupo nitrilo, el que fue sustituido por un grupo metilo. Sin embargo, por el mecanismo a través del cual las bacterias se hacen resistente a estos antibióticos es por la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT), que acetila los grupos hidroxilos en los carbonos 1 y 3 de cloranfenicol y tianfenicol. En cambio, florfenicol al poseer un átomo de flúor en el carbono 3, presenta menos sitios viables de acetilación de la enzima bacteriana CAT, haciendo de florfenicol un antibiótico más resistente a la inactivación bacteriana respecto a sus análogos anfenícoles (Adams *et al.*, 1987; EMEA, 1996; Sumano y Ocampo, 2006). El mecanismo de acción de este grupo es por medio de unión reversible a la subunidad ribosomal 50 S, inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas (Tabla 1). De acuerdo con Doublet *et al.*, (2005) existen mecanismos de resistencia mediante plásmidos como lo es el gen *floR*, descritos como sistemas de canales de expulsión.

Los β -lactámicos fueron sintetizados a partir del hongo *Penicillium*. Presenta una acción bactericida por el ataque sobre el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicanos que componen la pared celular. Los β -lactámicos se unen a una serie de enzimas conocidas como Proteínas ligadas a Penicilina (PLP), que se involucran en el estado final de la síntesis de la pared celular (Tabla 1) (Adams *et al.*, 1987). Usualmente la muerte bacteriana ocurre por lisis, debido a que se genera una pared celular débil que no soporta el medio interno por presiones osmóticas. La resistencia de los β -lactámicos resulta por la elaboración de β -lactamasas, enzimas que inactivan la droga por hidrolisis del anillo β -lactámico. Este mecanismo de resistencia se encuentra en el cromosoma o en plásmidos que pueden transferirse entre bacterias.

Las cefalosporinas son antibióticos de amplio espectro, originados a partir del hongo *Cephalosporium acremonium*. Todas las cefalosporinas fueron sintetizadas partir de la cefalosporina C, dando la clasificación en 4 generaciones, que

dependieron de la fecha de aparición y su actividad en el espectro bacteriano. Su mecanismo de acción es similar a los β -lactámicos. Presentando resistencia por la enzima que inactiva la droga mediante hidrólisis del anillo β -lactámico. La enzima es específica para las cefalosporinas llamada como cefalosporinasas que se encuentra codificado en el cromosoma y/o plásmidos bacterianos (Adams *et al.*, 1987).

Las tetraciclinas fueron aisladas de varias especies de *Streptomyces* y sus modificaciones estructurales fueron debidas a mejorar sus propiedades farmacocinéticas y actividades antimicrobiales. Poseen actividad bacteriostática, debido a que se unen a la subunidad 30S ribosomal, interfiriendo con la unión de amino acil-ARN_t con la unión ARN_m y consiguiente a la síntesis proteica (Tabla 1) (Adams *et al.*, 1987). El mecanismo de resistencia para tetraciclinas se debe a unidades genéticas móviles que transmiten los genes *tet* desde diferentes especies y en un amplio rango de géneros por conjugación, la mayoría de los genes *tet* han sido asociados con plásmidos móviles, transposones, transposon conjugativos e integrones (Mendez and Tachibana, 1980; Chopras y Roberts, 2001).

Los aminoglicósidos son antimicrobianos compuestos por distintas cepas de *Streptomyces* spp., *Micromonospora* spp., y *Bacillus* spp. Su mecanismo de acción es unirse de manera irreversible a una o más proteínas receptoras de la subunidad 30S del ribosoma, bloqueando la unión con el ARN_m (Tabla 1). Por otra parte, los aminoglucósidos son altamente nefrotóxico debido a su alta concentración de fosfolípidos, en forma particular de fosfatidilinositol (Adams *et al.*, 1987; Sastrasinh *et al.*, 1982). La resistencia a los aminoglucósidos está dada por unidades genéticas móviles, como plásmidos y transposones. Los genes identificados se reportaron como *RmtA* y *RmtB*, posteriormente se reportó la secuencia del gen *armA* (aminoglicósidos resistente metiltransferasa) de ubicación plasmidial (Yamane *et al.*, 2005; Galimand *et al.*, 2005).

Las sulfonamidas constituyen el grupo de antibióticos más antiguos y que sigue usándose hasta la actualidad. Sin embargo, el principal problema es su resistencia en una amplia gama de microorganismos, por lo que se asocia su uso a diaminopirimidina. El mecanismo de acción de las sulfonamidas es interferir en la producción de ácido fólico en conjunto a diaminopirimidina que interfiere en la cascada metabólica deteniendo la producción del ácido tetrahidrofólico (THFA) (Tabla 1) (Adams *et al.*, 1987). Las sulfonamidas en ausencia de diaminopirimidina se consideran bactericidas. Por otra parte, las sulfonamidas presentan un alto grado de toxicidad, que puede ser causal de queratoconjuntivitis seca, necrosis hepática, hipoprotrombinemia, anemia aplásica (Adams *et al.*, 1987). La resistencia a este grupo antibiótico ocurre por vía cromosomal y mediante plásmidos. La resistencia cromosomal tiende a ocurrir por el deterioro de la penetración de la droga al interior de la célula microbiana, produciendo una insensibilización mediante la enzima dihidropteroato. Una vez que los microorganismos adquieren la resistencia a sulfonamidas genera la resistencia a todos sus derivados (Adams *et al.*, 1987).

Genes de Resistencia a Antibióticos

En la actualidad se han identificado una serie de elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia, de estos los más conocidos son los plásmidos, los transposones, los integrones y cassettes genéticos de resistencia. Los procesos básicos de transferencia de genes entre bacterias son conjugación, transformación o transducción. Sin embargo, el flujo genético entre células puede ser entre diferentes comunidades bacterianas (Levy *et al.*, 1986). Salyers *et al.*, (1997) describe que bacterias que filogenéticamente no se encuentran relacionadas demuestran varios elementos genéticos iguales, incluso entre Gram positivas y negativas (Courvalin *et al.*, 1994; Doucet *et al.*, 1992).

Los integrones o elementos de integración son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia antibiótica en un mismo sitio, delimitado por secuencias nucleotídicas altamente conservadas. Las secuencias de ADN delimitan las regiones de genes de

resistencia con zonas conservadas como el 5' conservado (5'CD) de 1,33 kb y un extremo 3' conservado (3'CS) de 2 kb. Finalmente la zona con los determinantes de resistencia presentan una longitud variable y depende del número de genes insertos en dicho sitio. Se conocen cuatro tipos de integrones en función del tipo de integrasa, siendo el más conocido la familia de la clase 1 que son frecuentemente aislados de muestras clínicas (Sallen *et al.*, 1995).

Los integrones han sido detectados principalmente en bacilos gram negativos fermentadores de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* (Jones *et al.*, 1997) y en algunos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* (Bissonnette *et al.*, 1992). En *Salmonella*, en el serovar Typhimurium se han encontrado integrones de clase 1 portando múltiples combinaciones de cassettes con distintos genes de resistencia (Briggs *et al.*, 1999). Aunque normalmente la localización de estos integrones es cromosómica, también se ha descrito su localización en plásmidos conjugativos y no conjugativos. Las cepas donde se han localizado estos integrones son tanto de origen humano como animal, e incluso se han descrito en microorganismos presentes en el agua o en alimentos (Natasi and Mammina, 2001).

Los cassette genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles (Recchia *et al.*, 1997) que usualmente contienen un marco de lectura abierta completo (orf). Existe un sitio de recombinación específica denominado elemento de 59 pb o sitio *attC*, localizado en el extremo 3' del gen (Collins *et al.*, 1993; Patridge *et al.*, 2000). Los cassette genéticos no codifican enzimas u otros productos involucrados para su propia movilización. Son elementos que pueden existir libremente en forma de moléculas circulares covalentemente cerradas (Collins *et al.*, 1993; Patridge *et al.*, 2000), para la integración de los cassette desde un integron se genera con la acción de la integrasa en el sitio *attI*. Por otra parte la especificidad de la orientación de los cassette genético integrados permite su transcripción desde un promotor común localizado en el extremo 5' CS desde los integrones (Hall *et al.*, 1995).

Los diversos elementos genéticos móviles contribuyen a que un microorganismo pase de ser vulnerable a resistente, generando un conjunto de genes (resistoma) que contribuyen de manera directa o indirecta a la resistencia de los antibióticos.

De acuerdo a los datos de las Naciones Unidas (2017), la población mundial se ha triplicado desde 1950 hasta el 2015 y la esperanza de vida ha aumentado entre un 25-30%. Sin embargo, la alianza tripartita entre la Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y OPS reconocen que para el año 2050 es una amenaza creciente la resistencia antimicrobiana, se prevé que cause 10 millones de fallecimientos anuales y que dos tercios de la población mundial vivan en zonas urbanas. Por lo tanto, cada año la población humana va en aumento y se vive más años. Por lo que hoy en día la existente demanda mundial de proteína ha generado que existan sistemas de alta salud para la producción de animales y es el desafío de generar alimento para el año 2050. De acuerdo a los datos consultados en FAO (FAO, 2017) la producción mundial para el año 2014 corresponde a 311,8 millones de toneladas con una variación anual del 1,1%. Por lo tanto, el uso de antimicrobianos en sistemas productivos asegura la eficacia de la producción y sobrevivencia de los animales. Sin embargo, la acción profiláctica está generando la selección de bacterias resistente (Williams *et al.*, 2016). Los microorganismos que sobreviven en el alimento pueden llegar al ser humano generando fallas en el tratamiento y una disminución en la tasa de acción terapéutica. En la actualidad uno de los tratamientos de última línea de ataque es Colistin, el cual se había dejado de utilizar debido a que generaba nefrotoxicidad y neurotoxicidad. Sin embargo, no están quedando herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano. De acuerdo a los datos publicados por Liu *et al.*, (2016) señala que ha detectado resistencia a Colistin en aislado de animales y humanos en China.

El impacto económico que pueden causar las resistencias antimicrobianas es grande, por lo que son diversas variables y perspectivas involucradas, por ejemplo está el punto de vista médico, de los pacientes, el negocio del cuidado de la salud,

la industria farmacéutica y el público. Se necesitan mejores métodos para evaluar las implicaciones prácticas desde todas estas perspectivas. Dado que los estudios realizados hasta la fecha se han visto obstaculizados por su pequeño tamaño y falta de uniformidad, la validez de la información proporcionada no es clara y la extrapolación de los estudios regionales o nacionales e internacionales es cuestionable. Se requieren estudios poblacionales sobre el impacto real de la resistencia, con un tamaño suficiente y adecuado, lo que sería útil para ayudar a abordar la problemática de las diferentes perspectivas y detectar la verdadera magnitud de las repercusiones económicas de la resistencia a los antimicrobianos. El impacto general de la resistencia a los antimicrobianos de drogas merece más atención, tanto por parte del gobierno como de los profesionales del área (McGowan, 2001).

En nuestro país faltan aún identificar los aislados de *Salmonella spp.* de origen animal y ambiental que pueden ser multirresistentes a drogas y diseminar la resistencia bacteriana. Es importante lograr identificar aquellas bacterias que diseminan la resistencia con mayor velocidad, y el mecanismo por el cual lo hacen, además de continuar con la investigación en el ámbito nacional para aislados de diversos orígenes (García, 2003).

Precisamente el estudio tiene como objetivo determinar la resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípica de los serovares de *Salmonella enterica* aislados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, Chillán a partir de diferentes especies de animales. Para la determinación fenotípica se utilizaron el método Kirby-Bauer y la Concentración Mínima Inhibitoria a siete de los fármacos más utilizados. Para luego caracterizar los genes de resistencia mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La resistencia a tres o más antibióticos de grupos farmacológicos no relacionados se considera como multirresistencia a antimicrobianos (MRA).

IV. HIPÓTESIS

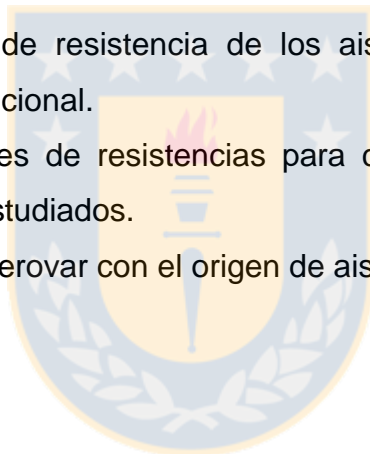
Los serovares de *Salmonella enterica* aislados de diferentes especies de animales presentan multirresistencia antimicrobiana a tres o más antibióticos.

Objetivo general

Identificar la multirresistencia antibiótica fenotípica y genotípica de los serovares de *Salmonella enterica* aislados, mediante técnicas tradicionales y moleculares.

Objetivos específicos

- I. Evaluar la susceptibilidad de los serovares de *Salmonella enterica* a 7 antibióticos (de mayor utilización) a través de técnica Kirby Bauer y CMI₅₀ CMI₉₀.
- II. Identificar los genes de resistencia de los aislados de *Salmonella enterica* mediante PCR convencional.
- III. Establecer los patrones de resistencias para cada uno de los serovares de *Salmonella enterica* estudiados.
- IV. Relacionar el tipo de serovar con el origen de aislamiento.



V. MATERIALES Y MÉTODO

Muestras de *Salmonella*.

Se estudiaron un total de 33 serovares de *Salmonella enterica* desde muestras de diferentes orígenes (Tabla 2). Los serovares aislados fueron tipificados y confirmados en el ISPCH, para luego del cultivo microbiológico almacenarlos a -20°C en el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad de Concepción hasta el momento de su utilización.

Tabla 2. Serovares de *Salmonella enterica* y origen de aislado.

Serovares	Gaviota	Ambiente	Cerdo	Equino	Bovino	Total
S. Anatum	2	0	1	0	0	4
S. Derby	0	2	2	0	0	4
S. Enteritidis	7	0	3	0	0	9
S. Infantis	4	1	3	0	0	8
S. Senftenberg	2	1	0	0	0	4
S. Typhimurium	0	0	2	1	1	4
Total	15	4	11	1	1	33

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Cada uno de los serovares de *S. enterica* fueron cultivados en agar XLD (Merck®) durante 48 horas a 42°C. Luego de su crecimiento se seleccionó una colonia aislada de *Salmonella* la que fue inoculada en caldo cerebro corazón (Merck®) durante 24 h a 37°C. Se estandarizó la densidad del inóculo, utilizando el estándar de turbidez 0,5 McFarland correspondiente a un desarrollo de 1,5x10⁸ UFC/ml, considerado por el procedimiento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Cona *et al.*, 2002).

Los aislados de *Salmonella enterica* se enfrentaron a 7 antibióticos comerciales: florfenicol (Flo) 30µg (Chemie®), amoxicilina (Amx) 20µg (Chemie®), ceftiofur (Cef) 30µg (Oxoid®), gentamicina (Gen) 10µg, oxitetraciclina (Oxi) 30µg (Chemie®),

sulfadiazina (Sui) 25µg (Valtek S.A.[®]), y enrofloxacino (Enr) 30µg (Bayer[®]) utilizando el método de Kirby-Bauer de difusión sobre agar Müeller Hinton. Los discos de antibióticos se ubicaron a 25 mm entre ellos para evitar la superposición de la zona de inhibición. Se incubaron a 37°C por 20 h en una atmósfera aeróbica. La susceptibilidad antibiótica se midió de acuerdo al diámetro que presentó el halo de inhibición del disco del antibiótico, de acuerdo a los estándares descritos por Clinical & Laboratory Standards Intitute (CLSI) (CLSI, 2008) (Tabla 3). Como cepas controles se utilizó *E. coli* ATCC 25922 como control negativo y *S. enterica* ATCC[®] 31194[™] como control positivo.

Tabla 3. Concentraciones utilizadas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en los aislados de *Salmonella enterica*.

Niveles de susceptibilidad y resistencia					
Antibiótico	Abreviación	Kirby Bauer(mm)		CMI µg/ml	
		Resistente a (mm)	Sensible a (mm)	Resistente a (µg/ml)	Sensible a (µg/ml)
Florfenicol	Flo	≤12	≥18	≥32	≤8
Amoxicilina	Amx	≤13	≥17	≥32/16	≤8/4
Enrofloxacino	Enr	≤16	≥23	≥4	≤1
Ceftiofur	Cef	≤17	≥21	≥8	≤2
Gentamicina	Gen	≤13	≥17	NT	NT
Sulfadiazina	Sul	NT	NT	≥512	≤256

NT : no testeado mediante este método

Los niveles de susceptibilidad y resistencia son los especificados en el CLSI (CLSI, 2008)

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

De acuerdo a las indicaciones del CLSI (2008), se determinó la CMI del antibiótico para los serovares de *S. enterica*, por medio del método de dilución seriada en caldo Müeller Hinton. Se preparó una solución madre para cada uno de los antibióticos a una concentración inicial de 2048 µg/mL (CLSI, 2008). Se utilizaron

las mismas cepas controles que para el método anterior *E. coli* ATCC 25922 como control negativo y *S. enterica* ATCC® 31194™ como control positivo a la resistencia antibiótica. La lectura de los tubos en caldo Müeller-Hinton se realizó luego de 24 horas a 37°C. En caso de presentarse crecimiento bacteriano el tubo anterior a éste se considera como la CMI expresado en µg/ml correspondiente. Se determinó la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI₅₀) y 90 (CMI₉₀) para cada uno de los antibióticos estudiados.

Determinación de genes de resistencia.

El estudio molecular se realizó en el Laboratorio de Fisiología Animal y Laboratorio Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción campus Chillán.

Extracción de ADN. El método de extracción de ADN fue realizado utilizando el método de lisis térmica descrito por Yañez *et al.*, (2008).

Cuantificación de ADN extraído fue medida utilizando espectrofotometría Infinite 200 PRO (TECAN).

Análisis de secuencia de ADN mediante PCR convencional. se utilizaron 7 primer de los antibióticos seleccionados de las familias aminoglicósidos, β-lactámicos, fenícoles, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas (Tabla 4). Cada desoxirribonucleico está a una concentración de 0,25 mM, 0,05 de *taq Kapa* ADN polimerasa, y 50 pmol de cada primer. La reacción de PCR convencional se realizó utilizando un ciclo a 95°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Finalmente se realizó un último ciclo de 72°C por 7 minutos (Clewell *et al.*, 1985). Luego se preparó un gel de agarosa al 1,5%, utilizando buffer TAE 1X, se agregó 1,7 µL de GelRed Nucleic Acid Gel Stain, (10,000X, Biotium). En el primer pocillo se colocaron 2 µL de AccuRuler 1 kb DNA RTU Ladder (Maestrogen) y en los siguientes las muestras (4 µL de muestra y 1 µL de buffer de carga 6x). El buffer de corrida utilizado fue TAE 1X y la electroforesis se llevó a cabo a 110 volt por 100 min. Posteriormente, el gel fue visualizado en un transiluminador UV.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en ensayos de PCR convencional para la identificación de la resistencia antimicrobiana en serovares de *Salmonella enterica*.

Familia antibiótica	Resistencia genes	Secuencia de Primer		Referencias
		Forward primer (5'-3')	/ Reverse primer (3'-5')	
Anfenícoles	<i>Flo</i>	CTGAGGGTGTGTCATCTAC/GCTCCGACAATGCTGAC TAT		Chen <i>et al.</i> , 2004
B-lactámicos	<i>bla_{tem1}</i>	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA/ACTCCCCGTCGTGTAGA		Chen <i>et al.</i> , 2004
Cefalosporina	<i>bla_{CMY-2}</i>	TAA TGGCCGTTGCCGTTATCTAC/CCCGTTTTATGCACCCAT GA		Chen <i>et al.</i> , 2004
Tretaciclina	<i>Tet(A)</i>	GCGCCTTTCCTTTGGGTTCT/CCACCCGTTCCACGTTGT TA		Chen <i>et al.</i> , 2004
Aminoglucósidos	<i>aph(3)IIa</i>	TCCGGTGCCCTGAATGAACT/ACGGGTAGCCAACGCTA TGT		Chen <i>et al.</i> , 2004
Sulfonamidas	<i>SulI</i>	TCACCGAGGACTCCTTCTTC/CAGTCCGCCTCAGCAATA TC		Chen <i>et al.</i> , 2004
Quinolonas	<i>qnrD</i>	CGAGATCAATTTACGGGAATA/ AACAAAGCTGAAGCGCCTG		Cavaco <i>et al.</i> , 2009

Determinación de patrones de multirresistencia

Se establecieron los patrones de resistencia antimicrobiana para cada serovar de *Salmonella* de acuerdo a los resultados obtenidos de las técnicas tradicionales (Kirby Bauer, CMI 50 y 90) asociado a los resultados obtenidos por PCR convencional. Se consideraron para cada serovar como multirresistente a antimicrobiano (MRA) cuando una cepa presentó resistencia a tres o más antibióticos de grupos farmacológicos diferentes. Así se estableció una base de datos para desarrollar el análisis estadístico.

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados de la resistencia antibiótica fueron analizados utilizando estadística descriptiva que incluyó tablas de frecuencias absolutas y relativas analizadas mediante Fisher Exact.

La relación entre la resistencia de antibiótico con el serovar de *Salmonella* y el origen de aislamiento se evaluaron mediante análisis de correlaciones múltiples (MCA) utilizando el software Infostat (Infostat Version 2008).



VI. RESULTADOS

En las pruebas de sensibilidad antimicrobiana por difusión (método Kirby Bauer) 21 cepas (63%) fueron resistente a alguno de los antimicrobianos utilizados en el presente estudio (Tabla 5). Los serovares que presentaron mayor porcentaje de resistencia fueron sulfadiazina (100%), oxitetraciclina (57,58%), amoxiciclina (12,12%), gentamicina (9,09%), ceftiofour (3,03%), enrofloxacino (3,03%) y finalmente florfenicol (0,00%) (Tabla 6).

Tabla 5. Porcentaje de serovares de *Salmonella* resistentes (Método Kirby Bauer) según origen de aislamiento.

Serovar Total	Ambiente		Bovino		Equino		Porcino		Gaviota		Total por serovar	
	n	(%)	N	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
S. Anatum (4)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	1	(3,03)	1	(3,03)	2	(6,06)
S. Derby (4)	1	(3,03)	0	(0,00)	0	(0,00)	2	(6,06)	0	(0,00)	3	(9,09)
S. Enteritidis (8)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	1	(3,03)	2	(6,06)	3	(9,09)
S. Infantis (9)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	3	(9,09)	3	(9,09)	6	(18,18)
S. Senftenberd (4)	1	(3,03)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	2	(6,06)	3	(9,09)
S. Typhimurium (4)	0	(0,00)	1	(3,03)	1	(3,03)	2	(6,06)	0	(0,00)	4	(12,12)
Total por origen (33)	2	(6,06)	1	(3,03)	1	(3,03)	9	(27,27)	8	(24,24)	21	(63,64)

Tabla 6. Distribución de cepas de *S. enterica* con resistencia a algún antibiótico según serovar y origen de aislamiento de acuerdo a método Kirby Bauer.

Antimicrobiano	Según Serovar		Según origen		Total N° (%)	
	N°	(%)	N°	(%)		
Oxitetraciclina	S. Anatum	2	(6,06)	Alimento	2	(6,06)
	S. Derby	2	(6,06)	Bovino	1	(3,03)
	S. Enteritidis	3	(9,09)	Equino	1	(3,03)
	S. Infantis	6	(18,18)	Porcino	8	(24,24)
	S. Senftenberd	2	(6,06)	Gaviota	7	(21,21)
	S. Typhimurium	4	(12,12)			19

Antimicrobiano	Según Serovar		Según origen			Total		
		N°	(%)		N°	(%)	N°	(%)
Enrofloxacino	S. Anatum	0	(0,00)	Ambiente	0	(0,00)	1	(3,03)
	S. Derby	0	(0,00)	Bovino	0	(0,00)		
	S. Enteritidis	0	(0,00)	Equino	0	(0,00)		
	S. Infantis	0	(0,00)	Porcino	1	(3,03)		
	S. Senftenberd	0	(0,00)	Gaviota		(0,00)		
	S. Typhimurium	1	(3,03)					
Amoxicilina	S. Anatum	0	(0,00)	Ambiente	0	(0,00)	4	(12,12)
	S. Derby	2	(6,06)	Bovino	0	(0,00)		
	S. Enteritidis	1	(3,03)	Equino	1	(3,03)		
	S. Infantis	0	(0,00)	Porcino	3	(9,09)		
	S. Senftenberd	0	(0,00)	Gaviota		(0,00)		
	S. Typhimurium	1	(3,03)					
Ceftiofour	S. Anatum	0	(0,00)	Ambiente	0	(0,00)	1	(3,03)
	S. Derby	0	(0,00)	Bovino	0	(0,00)		
	S. Enteritidis	0	(0,00)	Equino	0	(0,00)		
	S. Infantis	1	(3,03)	Porcino	0	(0,00)		
	S. Senftenberd	0	(0,00)	Gaviota	1	(3,03)		
	S. Typhimurium	0	(0,00)					
Gentamicina	S. Anatum	0	(0,00)	Ambiente	0	(0,00)	3	(9,09)
	S. Derby	0	(0,00)	Bovino	0	(0,00)		
	S. Enteritidis	1	(3,03)	Equino	0	(0,00)		
	S. Infantis	2	(6,06)	Porcino	1	(3,03)		
	S. Senftenberd	0	(0,00)	Gaviota	2	(6,06)		
	S. Typhimurium	0	(0,00)					
Sulfadiazina	S. Anatum	4	(12,12)	Ambiente	4	(12,12)	33	(100,0)
	S. Derby	4	(12,12)	Bovino	1	(3,03)		
	S. Enteritidis	8	(24,24)	Equino	1	(3,03)		
	S. Infantis	9	(27,27)	Porcino	12	(36,36)		
	S. Senftenberd	4	(12,12)	Gaviota	15	(45,45)		
	S. Typhimurium	4	(12,12)					
Florfenicol	S. Anatum	0	(0,00)	Ambiente	0	(0,00)	0	(0,00)
	S. Derby	0	(0,00)	Bovino	0	(0,00)		
	S. Enteritidis	0	(0,00)	Equino	0	(0,00)		
	S. Infantis	0	(0,00)	Porcino	0	(0,00)		
	S. Senftenberd	0	(0,00)	Gaviota	0	(0,00)		
	S. Typhimurium	0	(0,00)					

Del total de cepas estudiadas el 15,15% presentó MRA, que corresponde a 3 de los serovares aislados en este estudio por el método de difusión. Estos serovares fueron *S. Typhimurium* (6.06%), *S. Infantis* (6.06%) y *S. Enteritidis* (3,03%) (Tabla 7).

Tabla 7. Número y porcentaje de serovares de *S. enterica* con MRA en relación a su origen de aislamiento.

Cepa bacteriana	Equino		Porcino		Gaviota		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>S. Enteritidis</i>	0	(0,00)	1	(3,03)	2	(3,03)	2	(6,06)
<i>S. Infantis</i>	0	(0,00)	1	(3,03)	1	(3,03)	2	(6,06)
<i>S. Typhimurium</i>	1	(3,03)	1	(3,03)	0	(0,00)	2	(6,06)
Total	1	(3,03)	3	(9,09)	1	(3,03)	5	(15,15)

Se encontraron 4 patrones de MRA diferentes mediante el método de difusión (FIGURA 1). Los patrones de MRA analizados que repitieron en dos cepas incluyen 3 antibióticos oxitetraciclina, sulfadiazina y amoxicilina encontrada en *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Además gentamicina, oxitetraciclina, sulfadiazina encontradas en *S. Enteritidis* y *S. Infantis* (Tabla 8).

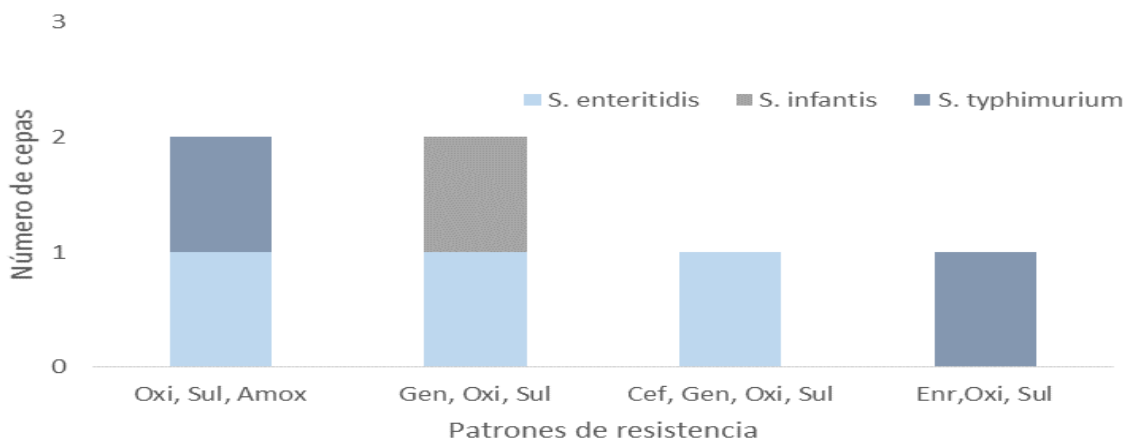


Figura 1. Número de serovares de *Salmonella* distribuidas según patrones de resistencia observados.

Tabla 8. Patrones de resistencia a múltiples antimicrobianos en serovares de *Salmonella* aislados (Método Kirby Bauer).

Serovar	Número de aislado		Patrones de resistencia antimicrobiana MRA	
	Analizados	Resistente a uno o más antimicrobiano	(Número de serovares resistente/especie)	
S. Anatum	4	2	**	
S. Derby	4	3	**	
S. Enteritidis	8	3	Oxi, Sul, Amox	(1/cerdo)
S. Infantis	9	6	Gen, Oxi, Sul	(1/gaviota)
			Cef, Gen, Oxi, Sul	(1/gaviota)
S. Senftenberd	4	3	**	
S. Typhimurium	4	4	Oxi, Sul, Amox	(1/equino)
			Enr,Oxi, Sul	(1/cerdo)

** No hubo serovares multirresistente a drogas en estos aislados.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

En relación a la susceptibilidad *in vitro* se observó que para ceftiofur los rangos de CMI variaron entre 0,5 - 512 µg/mL, con una CMI₉₀ de 8 µg/mL (Tabla 9). El 24,24% de las cepas estudiadas fueron resistentes, 12,12% presentó una susceptibilidad intermedia y el 63% de los serovares fue susceptible. Los serovares resistentes corresponden a S. Derby, S. Infantis, S. Typhimurium, S. Anatum y S. Senftenberd las que fueron aisladas de porcino, ambiente y gaviotas. Las cepas de *Salmonella* dentro de la distribución para ceftiofur se concentró con un 45,45% a una CMI igual a 1 µg/ml (Tabla 10).

Para enrofloxacinó los rangos de CMI fueron 0.5 - 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con una CMI_{90} de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 9). Todos los serovares presentaron susceptibilidad para este antimicrobiano. Las Cepas de *Salmonella* presentó dentro de la distribución del CMI un 72.73% para la concentración 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tabla 10).

En amoxicilina, 3 cepas (*S. Typhimurium*, *S. Derby* y *S. Enteritidis*) resistentes por el método Kirby-Bauer fueron también resistentes según el análisis de CMI. Los rangos de CMI fueron 1-512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una CMI_{90} de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 9). De acuerdo a la distribución que presentó la las cepas de *Salmonella* un 39.39% se concentró en 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Tabla 10).

Los rangos de CMI de florfenicol analizados fueron 0.5-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una CMI_{90} de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 9). Se observó un 15.15% de cepas resistentes provenientes de cerdo (*S. Infantis* y *S. Derby*) y de gaviotas (*S. Enteritidis* y *S. Anatum*). De acuerdo a la distribución de CMI las cepas de *Salmonella* se concentraron en un 21.21% en 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Tabla 10).

En oxitetraciclina los rangos de CMI fueron 32-512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una CMI_{90} de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 9). El 100% de los serovares fueron resistentes. De acuerdo a la distribución de CMI en las cepas de *Salmonella* se concentraron en 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Tabla 10).

Las sulfadiazina la CMI fue de 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una CMI_{90} de 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Y su distribución fue de 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Tabla 10). Presentándose resistencia en todos los serovares.

Finalmente gentamicina presenta resistencia en un 93% de las muestras con rangos de CMI de 16 - 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una CMI_{90} de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 9). El 33% se concentró entre 64 y 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 10).

Tabla 9. Rango intercuantil y CMI 50 y 90 por el método de Macrodilusión (n=33).

Antimicrobiano	RIC (µg/mL)	CMI 50 (µg/mL)	CMI 90 (µg/mL)
Oxitetraciclina	32 – 512	256	512
Ceftiofur	0,5 – 512	2	8
Amoxicilina	1 – 512	256	512
Gentamicina	16 – 512	128	256
Enrofloxacino	0,5 – 4	1	2
Florfenicol	0,5 – 128	4	32
Sulfadiazina	2048	2048	2048

*RIC: rango intercuantil

El análisis gráfico exploratorio para explicar la variabilidad que existe entre la presentación de resistencia antibiótica, con los orígenes de las cepas, permite apreciar las combinaciones que se relacionan más estrechamente. Esto se puede visualizar en la representación gráfica de las dos dimensiones que agrupan la mayor variabilidad de los datos del MCA realizado (Figura 2).

La variabilidad entre las cepas resistentes que se agrupan hacia la izquierda en comparación a las cepas susceptibles que se agrupa en el eje hacia la derecha. Esto indicaría que las resistencias y susceptibilidades pudiesen asociarse a algún tipo de factor o efecto, dado que todas estas variables no estarían actuando de forma independiente.

Genes de resistencia antimicrobiana

Se encontraron 16 cepas (48.48%) que fueron resistente a alguno de los genes de resistencia antimicrobiana utilizados en el presente estudio (Tabla 11). Se observa la amplificación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las bandas de los genes de resistencia: *Bla_{CMY-2}* (Figura 4), *Sul-1* (Figura 5), *Bla_{tem-1}* (Figura 6), *Aph(3)IIa* (Figura 7), *qnrD* (Figura 8), *Tet(A)* (Figura 8).

Se encontraron 9 patrones de MRA diferentes mediante la caracterización genotípica (Figura 3). Los patrones de MRA analizados que repitieron en cinco cepas incluyen 3 genes de resistencia para *Bla_{tem-1}*, *Sul-1* y *bla_{CMY2}* encontrada en *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Senftenberg*, *S. Derby* y *S. Typhimurium* (Tabla 12).

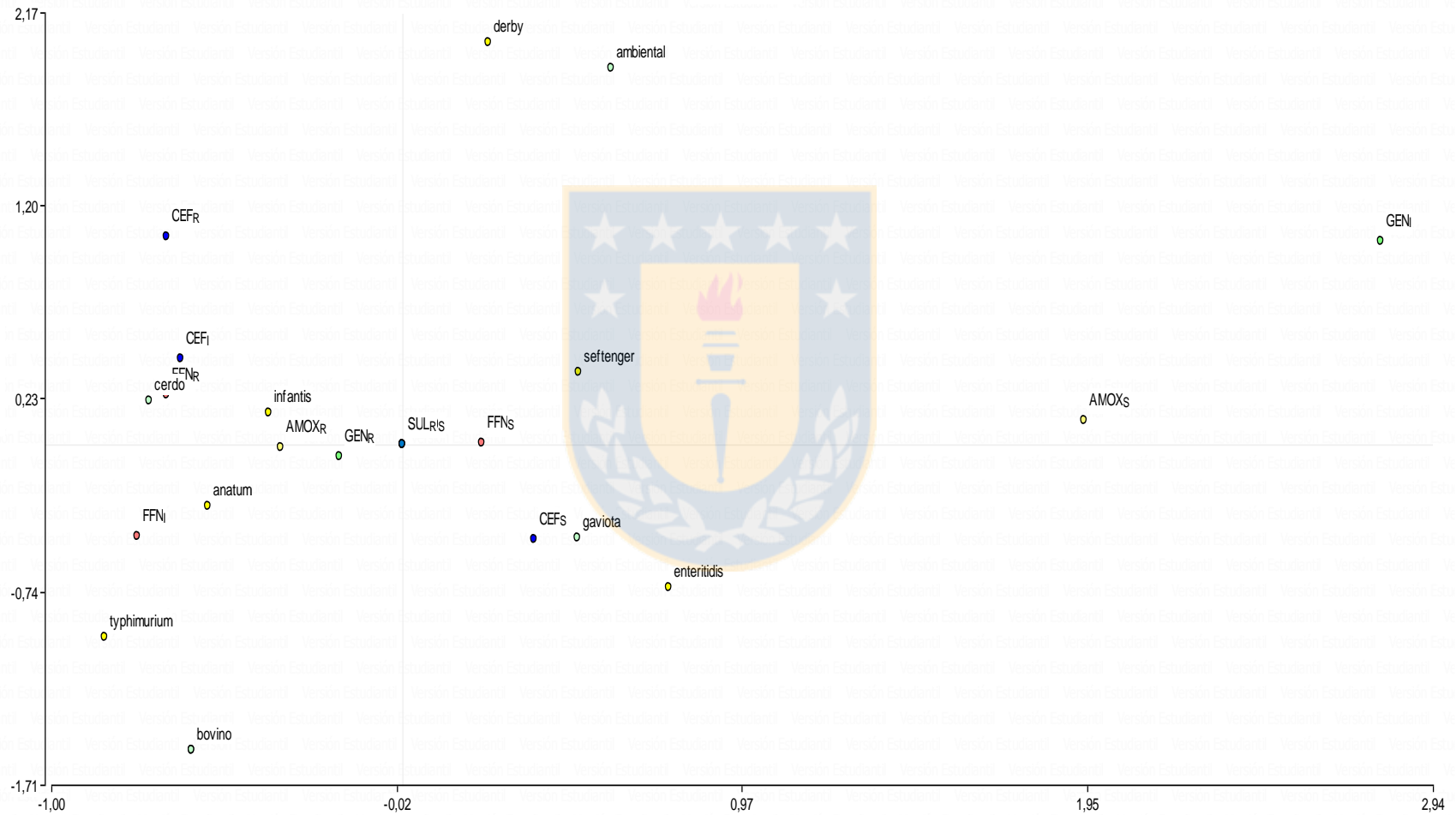


Figura 2. Relación entre susceptibilidad antibiótica y origen de las serovares de *Salmonella*.

Tabla 10. Distribución de CMI y Resistencia (%) en *Salmonella entérica* (n=33) desde animales.

Antimicrobiano	%Resistencia	Distribución % CMI ($\mu\text{g/mL}$)												
		0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
Amoxicilina	84,84		3,03	3,03	6,06			15,15	9,09	6,06	39,39	18,18		
Ceftiofur	24,24	3,03	45,45	15,15	12,12	12,12	6,06				3,03		3,03	
Florfenicol	15,15	1,52	15,15	15,15	21,21	9,09	9,09	3,03	6,06	6,06				
Gentamicina	93,93						6,06	3,03	33,30	33,33	24,24	3,03		
Enrofloxacino	0	6,06	72,73	18,18	3,03									
Sulfadiazina	100													100
Oxitetraciclina	100							12,12	9,09	9,09	21,21	45,45		

Tabla 11. Número y porcentaje de serovares de *S. enterica* con MRA en relación a su origen de aislamiento.

Cepa bacteriana	Equino		Porcino		Gaviota		Ambiente		Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
S. Derby	0	0,00	1	3,03	0	0,00	2	6,06	3	9,09
S. Anatum	0	0,00	1	3,03	0	0,00	0	0	1	3,03
S. Senftenberd	0	0,00	1	3,03	1	3,03	0	0	2	6,06
S. Enteritidis	0	0,00	1	3,03	2	6,06	0	0	3	9,09
S. Infantis	0	0,00	4	12,12	1	3,03	0	0	5	15,15
S. Typhimurium	1	3,03	1	3,03	0	0,00	0	0	2	6,06
Total	1	3,03	9	27,27	4	12,12	2	6,06	16	48,48

Tabla 12. Patrones de genes de resistencia a múltiples antimicrobianos en serovares de *Salmonella* aislados.

Serovares	Numero de aislado Resistente a		Patrones de resistencia antimicrobiana MRA (número de serovares resistente/especie)
	Analizados	uno o más AB	
S. Derby	4	3	Sul1, Aph(3)IIa, Blac _{YM2}
			Blat _{tem-1} , Sul1, Blac _{YM2}
			Sul1, Aph(3)IIa, tet(A), Blac _{YM2}
S. Anatum	4	1	Sul1, Aph(3)IIa, tet(A)
S. Senftenberd	4	2	Blat _{tem-1} , Sul1, Blac _{YM2} Blat _{tem-1} , Sul1, Blac _{YM2}
S. Typhimurium	4	2	Blac _{YM2} Blat _{tem-1} , Sul1, Blac _{YM2}
S. Enteritidis	8	3	Sul1, qnrD, tet(A), Blac _{YM2}
			Blat _{tem-1} , Sul1, tet(A)
			Blat _{tem-1} , Sul1, Blac _{YM2}
S. Infantis	9	5	Blat _{tem-1} , Sul1, Blac _{YM2}
			Blat _{tem-1} , Sul1, qnrD, Blac _{YM2}
			Sul1, Aph(3)IIa, qnrD, tet(A)
			Blat _{tem-1} , Sul1, Aph(3)IIa, qnrD

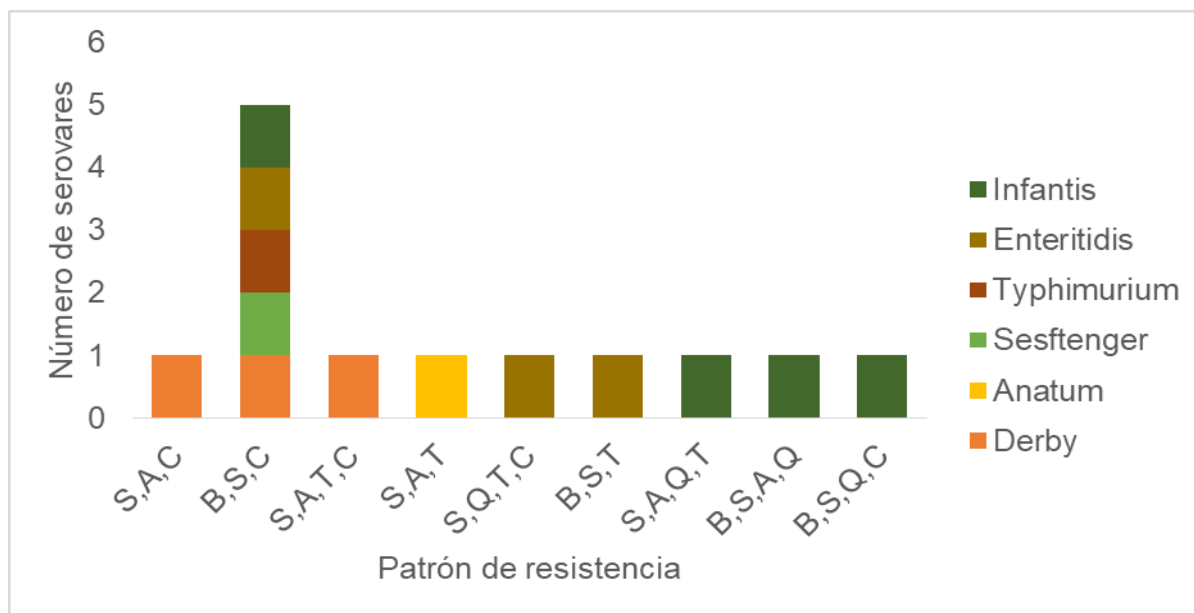


Figura 3. Número de serovares de *Salmonella* distribuidas según patrones de resistencia mediante amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). S,A,C : Sul1, Aph(3)IIa, Blac_{MY2}; B,S,C: Blat_{em1}, Sul1, Blac_{MY2}; S,A,T,C: Sul1, Aph(3)IIa, Tet(A), Blac_{MY2}; S,A,T: Sul1, Aph(3)IIa, Tet(A); S,Q,T,C: Sul1, qnrD, Tet(A), Blac_{MY2}; B,S,T: Blat_{em1}, Sul1, Tet(A); S,A,Q,T: Sul1, Aph(3)IIa, qnrD, Tet(A), Blac_{MY2}; B,S,A,Q: Blat_{em1}, Sul1, Aph(3)IIa, qnrD; B,S,Q,C: Blat_{em1}, Sul1, qnrD, Blac_{MY2}.

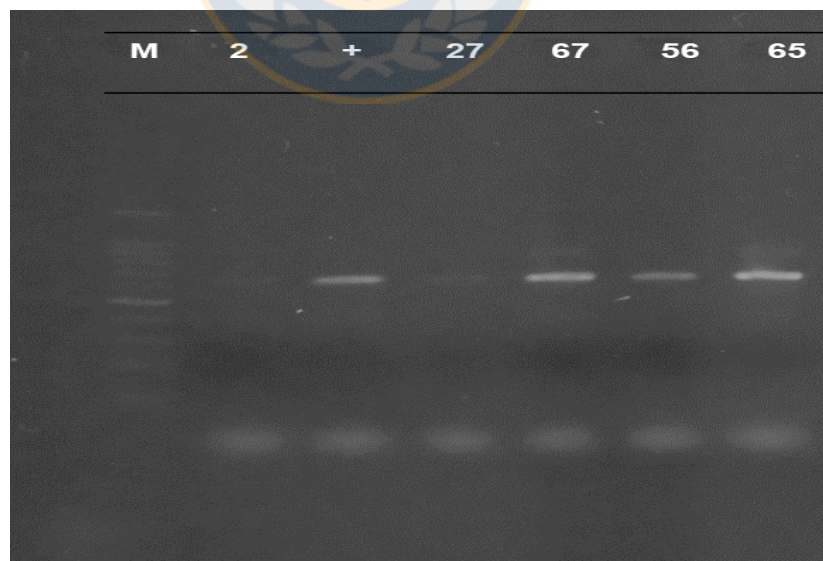


Figura 4. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen Blac_{MY-2}. Los números indican la cepa de *Salmonella* a la que representan, M es el marcador y “+” es el control positivo.

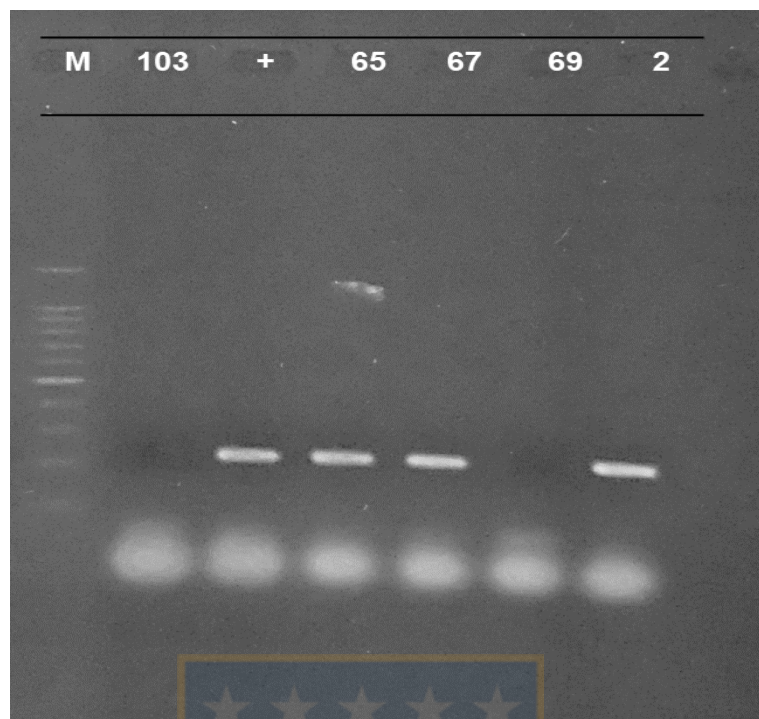


Figura 5. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen Sul-1. Los números indican la cepa de Salmonella a la que representan, M es el marcador y “+” es el control positivo.

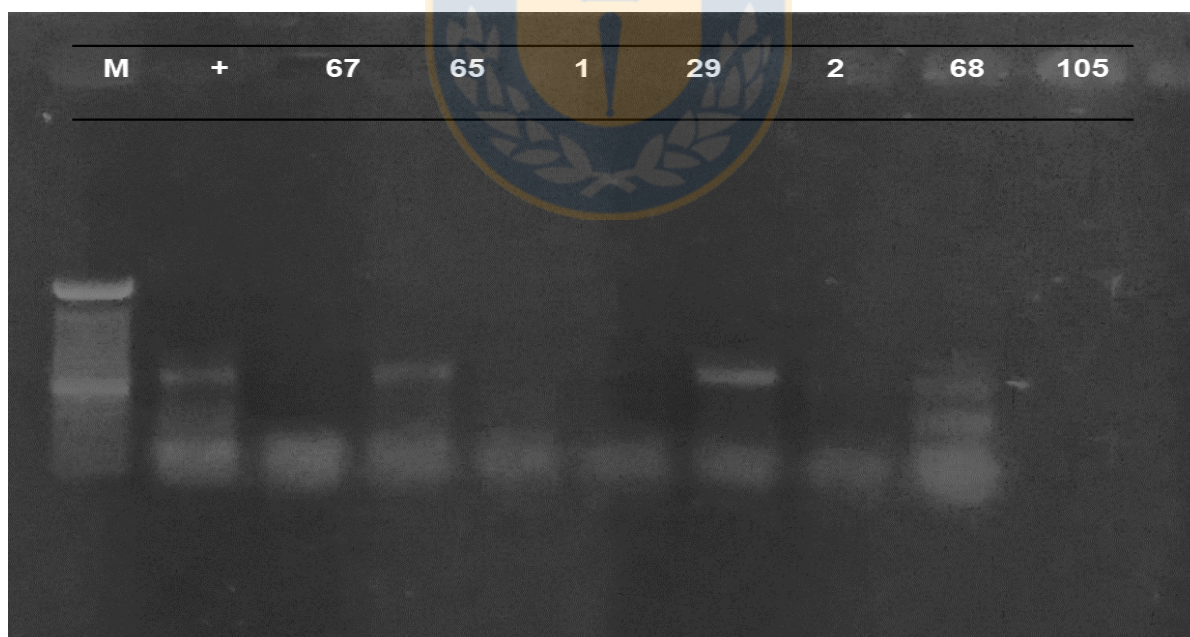


Figura 6. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen bla_{TEM-1}. Los números indican la cepa de Salmonella a la que representan, M es el marcador y “+” es el control positivo.

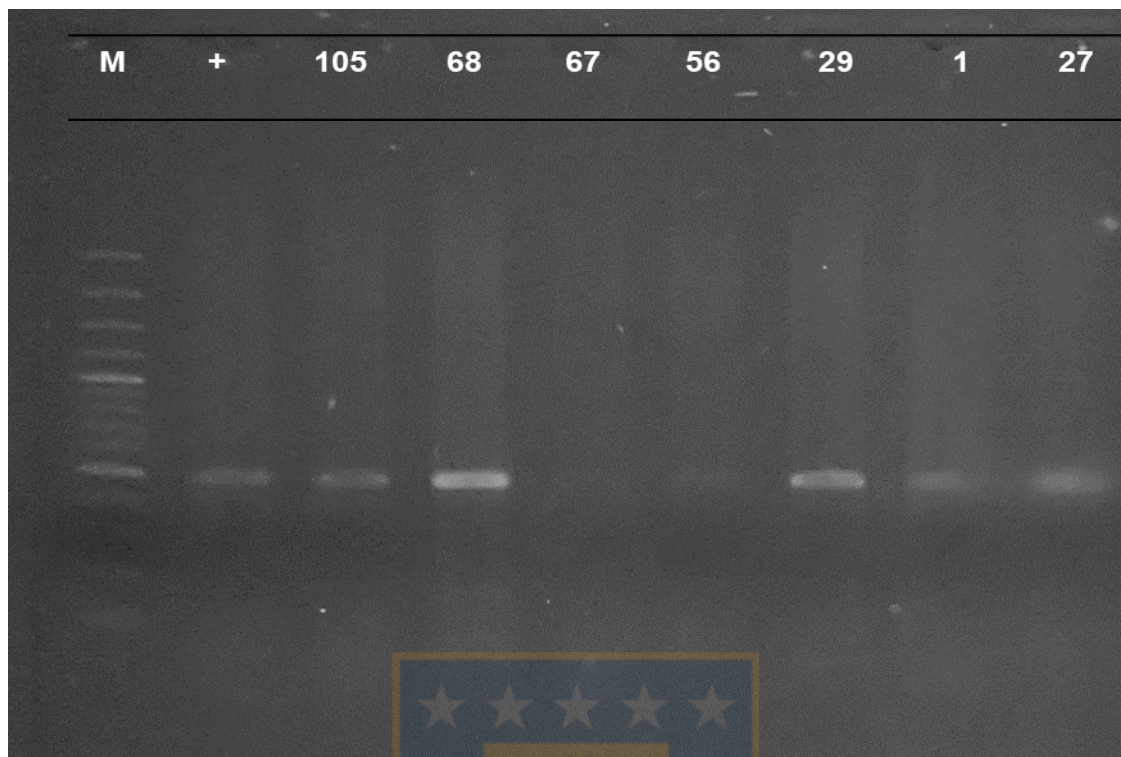


Figura 7. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen Aph(3)IIa. Los números indican la cepa de Salmonella a la que representan, M es el marcador y “+” es el control positivo.

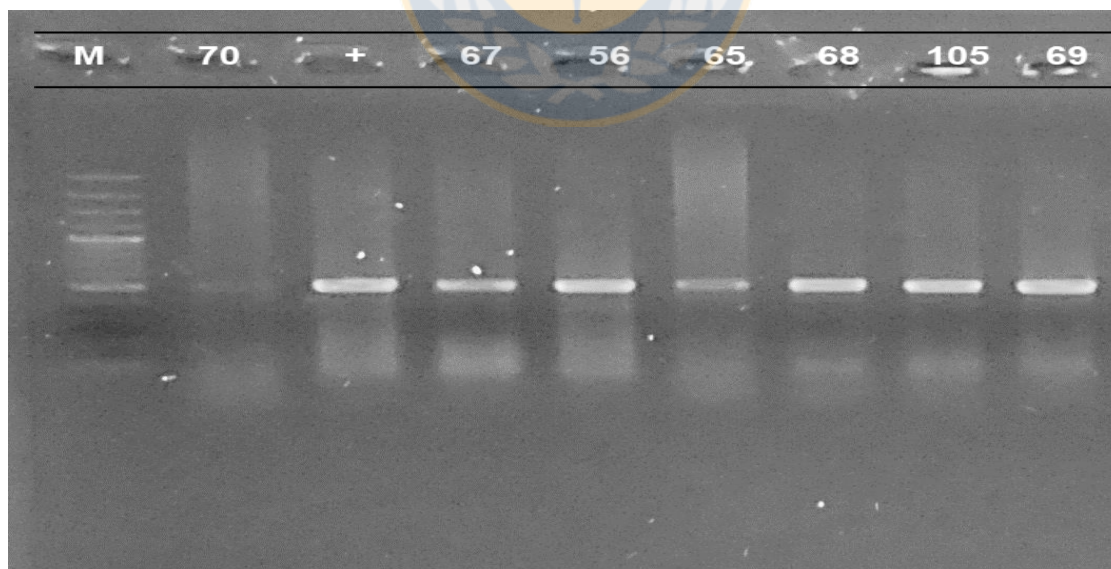


Figura 8. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen qnrD. Los números indican la cepa de Salmonella a la que representan, M es el marcador y “+” es el control positivo.

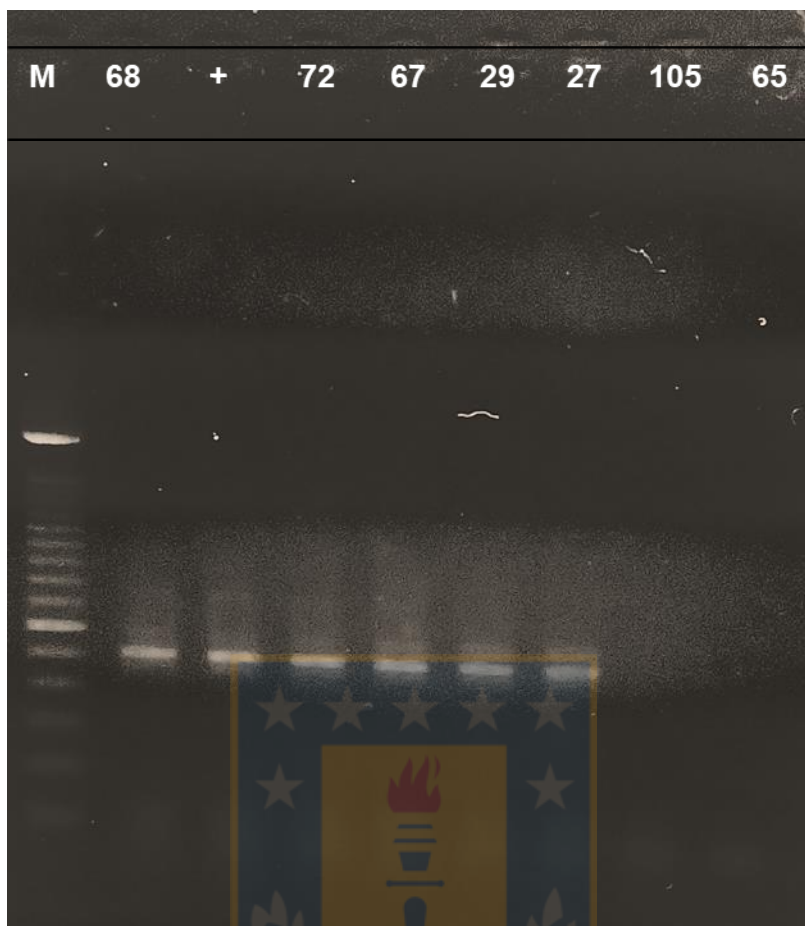


Figura 9. Amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen tet-A. Los números indican la cepa de Salmonella a la que representan, M es el marcador y “+” es el control positivo.

VII. Discusión

En el presente estudio se analizaron 6 serovares de *Salmonella enterica* encontrando resistencia antimicrobiana en el 63,64% de las muestras mediante el método de difusión (Kirby bauer), en los cuales se presentó en estado de MRA de un 15,15% de las cepas. El informe del programa NARMS (The National Antimicrobial Resistance Monitoring System) en el 2013 reveló que de los aislamientos de *Salmonella enterica* no tifoideales en estados de MRA sobre 5 o más antibióticos representa el 5% y que ha ido en aumento desde 1996. Sin embargo, Li *et al.* (2017) demostraron que en aislados de pollos destinados para el comercio presentaban un 99,3% resistente a un antimicrobiano y un 59,4% presentó MRA sobre 5 antibióticos. Cifras similares demostró un estudio realizado en España, de 238 aislamientos de *Salmonella enterica* de origen animal la resistencia frente al menos un antimicrobiano fue del 96% en aislamientos de *S. Typhimurium* (Crushaga *et al.*, 2001). En Colombia para el año 2010 un estudio realizado con 93 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de diversos alimentos, reportó que el 46% (n=40) de los aislamientos presentó resistencia al menos frente a un antimicrobiano, y la proporción de multiresistencia sólo alcanzó el 4,3%. (Karczmarczyk *et al.*, 2010). En contraste Bermúdez *et al.* (2013) demostró un aumento en la resistencia antimicrobiana en un 94,8% (n=147) de las cepas evaluadas de los beneficios porcinos de Colombia y en un 16,77% de los aislamientos mostró multiresistencia para amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, florfenicol y tetraciclina, siendo el patrón más comúnmente observado. Sanchez-Maldonado *et al.* (2017) mostraron la prevalencia y la resistencia desde canales porcinos de Canadá, los que resultaron en un 35% de los aislados fueron resistente a un antimicrobiano y 3,9% fueron MRA de alta importancia en medicina humana, estos porcentaje son similares a lo descrito por la NARMS. En Chile de acuerdo al Laboratorio de Referencia de Agentes ETAs del Instituto de Salud Pública presenta en su último boletín del año 2016 las muestras de *Salmonella* no tifoideas de origen intestinal destacando a *S. Typhimurium* y *S. Entititidis* con un número de muestras menor o igual a 30, durante los años 2012 al 2015 no se ha evidenciado resistencia para los antimicrobianos como ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacino, cloranfenicol y

cotrimoxazol, debido a que a éstos antimicrobianos se consideran de importancia crítica. Sin embargo, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* fueron 2 de los 3 serovares que presentaron MRA, que apoya el hecho de existe un aumento de la resistencia en los aislados de *Salmonella spp.* en nuestro país.

De acuerdo a los datos por CIPARS (Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance), en Canadá indican que en cerdos los serovares más aislados desde casos clínicos fueron *S. Derby* y *S. Thyphimurium*, desde la granja *S. Derby*, *S. Infantis* y *S. Thyphimurium* desde matadero (CIPARS, 2010). Es importante destacar que de las 12 cepas obtenidas desde cerdos, 5 corresponde a *S. Infantis*, 2 cepas a *S. Thyphimurium* y 2 cepas a *S. Derby*. Los serovares presentes suponen un mayor riesgo asociado a patógenos, según los casos de mayor relevancia para el ISP, (2016). Sin embargo, en el presente estudio no podemos extrapolar esta situación debido a que es un análisis de tipo descriptivo, sólo con cepas aisladas de muestras que llegan a laboratorio. Sin embargo, hay que señalar que para el serovar de *S. Infantis* presentó dos cepas MRA una aislada desde cerdo y otra de gaviota de Franklin. La posibilidad de transmisión de cepas resistentes al ser humano podría darse a lo largo de la cadena productiva, desde el consumo de alimentos de origen animal. Los serovares del presente estudio pertenece a la asociación de las diez principales serovariedades de *Salmonella spp.* causantes de infección para los humanos, que también han sido vinculadas a enfermedad para los animales (Foley y Lynne, 2008).

Hay que destacar que de las muestras de *S. enterica*, 15 fueron aisladas desde gaviotas de Franklin, que es un ave migratoria de amplia distribución en América, se describe desde Canadá y Estados Unidos hasta Perú, Argentina y en Chile, siendo en este último que presentan una distribución desde Arica hasta la zona de Magallanes (Schlatter *et al*, 2006). Las gaviotas de Franklin pueden actuar como diseminadoras de estos agentes bacterianos entre países hacia otros animales, incluido el hombre, o bien hacia los alimentos. La OPS (2005) indica que *S. Enteritidis* es el serovar de mayor frecuencia aislado en Chile. De acuerdo a lo descrito por Toro *et al.*, (2016) identificaron cepas chilenas de *Salmonella Enteritidis* desde diferentes aislados de gaviotas, huevos y de seres humanos, presentando

perfiles genéticos similares independientemente de la fuentes de aislamiento. Por lo tanto, concluyen que la probabilidad máxima de que las cepas ya estén circulando entre diferentes huéspedes y alimentos como vehículos en Chile. Estos hallazgos se ajustan a la evidencia previa molecular entre *S. Enteritidis* cepas recogidas humanos y pollos (Chai *et al.*, 2012), y de seres humanos con otros animales (Smith *et al.*, 2014). Por lo tanto, las gaviotas podrían representar un factor epidemiológicamente relevante reservorio de zoonosis *S. Enteritidis* en Chile. Las cepas de gaviotas del presente estudio arrojó MRA para *S. Enteritidis* mediante el método de difusión un patrón de resistencia gentamicina-oxitetraciclina-sulfadiazinas y para *S. Infantis* presentó un patrón de resistencia ceftiofour-gentamicina-oxitetraciclina-sulfadiazina De acuerdo con Toro *et al.*, (2016) encontraron 94% genes de resistencia en *S. Enteritidis* cepas chilenas, con un bajo porcentaje de polimorfismos en genes 6,1%. Dado que estos mismos serovares son un riesgo potencial pueden causar daño en la salud humana, es indispensable seguir vigilando la resistencia de estos serovares desde las aves migratorias. En la población chilena varios alimentos de origen animal incluyendo huevos, carne, pescado y mariscos (entre otros), han sido intervenidos en los brotes de *S. Enteritidis*, lo que sugiere que es posibles relacionar entre los aislamientos de *S. Enteritidis* de aves silvestres y cepas de *S. Enteritidis* en Chile, lo que puede explicar la aumento de la incidencia de salmonelosis en el país (Fresno *et al.*, 2013; Retamal *et al.*, 2015).

En la actualidad la demanda de los consumidores sobre la industria alimentaria es la exigencia de alimentos seguros e inocuos, lo que ha llevado a un aumento de la vigilancia y control de *Salmonella*. Los serovares como *S. Senftenberg*, *S. Derby* y *S. Anatum* son los más aislados en materias primas o piensos y sólo afectan esporádicamente a los animales y al hombre. Algunos de estos serovares también se han relacionado como causantes de infecciones subclínicas en los animales. Según Mejía (2003) el serovar de *S. Anatum* es encontrado con mayor frecuencia en los piensos destinado para el consumo de porcinos. De acuerdo a lo descrito por Bermúdez *et al.* (2013) *Salmonella spp.* ha sido aislada principalmente desde cerdos sanos que llegan a matadero, es decir, desde animales clínicamente sanos.

Aunque en Estados Unidos se describe del orden de 38,2% de granjas positivas a *Salmonella entérica* los porcentajes de cuadros de salmonelosis en cerdos no serían tan altos (Bahnsen, 2006). De acuerdo a los resultados de Papadopoulou *et al.*, (2009) en Inglaterra se detectaron 263 serovares de *Salmonella* desde alimentos destinados a consumo animal y desde el ganado se observó que el 14,1% de los aislados fue resistente al menos a un antibiótico y se presentó un estado de MRA en un 1,9%. En el presente estudio la multiresistencia fue mucho más alta, tal como se señaló anteriormente, lo que indicaría que se requiere de un control más estricto para evitar esta elevada resistencia. Papadopoulou *et al.* (2009), señalan en su estudio que no existe evidencia de asociación estadística entre los 10 serovares más aislados desde alimento y ganado. Esto apoya la teoría que los genes de resistencia pueden ser adquiridos desde el tracto digestivo del ganado ya que éste es el mayor reservorio bacteriano, y desde donde las cepas resistentes pueden ser diseminadas (Acar y Moulin, 2006). La resistencia usualmente pueden transferirse rápidamente entre diferentes especies o géneros bacterianos, especialmente entre la familia Enterobacteriaceae (Quinn *et al.*, 2000). En base a esto, podría ser esperable una alta resistencia en otras bacterias en la microbiota residente o bacterias patógenas, extendiendo la capacidad de diseminación de resistencia.

De acuerdo al listado de NARMS (CDC, 2010) los dos primeros de veinte serovares más comunes aislados desde humanos son *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Además, Usera *et al.* (2003) señala que *S. Derby* es un serovar que se aísla en ocasiones desde humanos, precisamente los resultados del presente estudio todas las cepas de *S. Typhimurium* fueron resistente al menos a un antimicrobiano. presentándose en condición de MRA para los aislados de equino y porcino. Para el caso del serovar *S. derby* todas las cepas fueron resistente para un antimicrobiano. Finalmente, el serovar *S. Enteritidis* resulto como MRA aislado desde gaviota de Franklin. Los serovares aislados desde alimentos destinados a consumo animal *S. Derby* y *S. Infantis*, fueron aislados desde cerdos cuyo destino final es ser consumidos por humanos, por lo que se puede inferir que el hecho que alimentos

destinados a consumo animal tengan el patógeno puede aumentar el riesgo que el producto de origen animal también lo tenga y de esa manera llegar al ser humano. De acuerdo a SVARM (Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring) indica que el 47% de los aislados entre 2000-2011 desde animales de producción corresponde al serovar *S. Thyphimurium* siendo el 23% de ellos resistente al menos a un antibiótico y el 7% cepas presentó MRA. En el presente estudio el 15.15% de los serovares de *Salmonella entérica* se detectó como MRA. Desde la perspectiva de salud pública la resistencia en las especies productivas pasaría a ser más importante que la observada en vida silvestre o mascotas (SVARM, 2017). Los diferentes serovares del presente estudio corresponden a serovares no tifoideos de *S. enterica*, que se aceptan como potencial zoonótico (SVARM, 2017) adquiriendo su resistencia en el huésped sea de origen animal o al ser humano (Threlfall, 2002). En los últimos años se ha producido un considerable aumento de cepas resistentes a antimicrobianos, de acuerdo a los datos de SVARM para el año 2009 presentaba un 14% de resistencia al menos a un antimicrobiano y para el año 2011 aumentó en un 9%. Lo que parece estar correlacionado al menos en parte, con el uso de antimicrobianos en animales destinados al consumo, podría deberse a promotores de crecimiento como parte de su alimentación o parte de un tratamiento inadecuado frente a diversas infecciones. Es por esto que cepas de origen alimentario o animal, que son resistentes a diferentes grupos de antibióticos, tal como lo observado en las cepas analizadas, pueden traspasarse a la microflora intestinal de otras especies animales. Las familias antibióticas que se han reportado con mayores resistencias han sido los β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos y sulfonamidas (Hur *et al.*, 2011; SVARM, 2017). De la misma forma los antimicrobianos que presentaron mayor porcentaje de resistencia mediante el método de difusión fueron sulfadiazina, tetraciclina, amoxiciclina y en menor porcentaje gentamicina, ceftiofour y enrofloxacino. Los antibiogramas dieron como resultado un alto porcentaje de resistencias entre las cepas de *Salmonella entericas* analizadas. La resistencia comúnmente detectada fue para oxitetraciclina con un 57,58% cifra similar a la detectada por Alaniz *et al.*, (1997) que alcanzaba un 57,4% en *Salmonella* de origen animal. Bermúdez *et al.* (2013) mostró un 98,84% de

resistencia en las cepas analizadas de los beneficios de cerdos en Colombia. Al igual que Ren *et al.* (2017) que demostró un 87,5% de resistencia a oxitetraciclina. Las muestras del presente estudio provienen del Laboratorio de Microbiología Veterinaria y se debe considerar que pueden proceder de animales enfermos que pudieron haber recibido tratamientos antibióticos. Por otra parte, la resistencia a Tetraciclina puede ser factible debido a que se utiliza frecuentemente como indicación metafiláctico en el alimento o agua de bebida en los sistemas productivos esté relacionada con las altas tasas de resistencia reportadas. Éste hallazgo puede ser además relevante respecto a la presión selectiva en las poblaciones bacterianas, ya que el mecanismo de resistencia asociado a este antimicrobiano suele ser por la codificación de bombas de flujo a través de plásmidos. En el caso de amoxicilina, la resistencia de *Salmonella* encontrada por Zamora *et al.*, (2006) en muestras de alimento fue de un 15% cifra que también se acerca al valor obtenido en el presente estudio donde la resistencia fue de un 12,12%. Bermúdez *et al.* (2013) demostró que para amoxicilina hubo un 35,48%. La resistencia de *Salmonella* por β -lactámicos puede atribuirse a la producción de β -lactamasas transferidas por plásmidos (Hur *et al.*, 2011), la resistencia presentada para amoxicilina podría sugerir la participación de dicha enzimas.

Es importante destacar que se encontró resistencias a ceftiofur (3,03%) y sulfadiazina (100%). Algunos de estos compuestos, junto a las tetraciclinas, han sido utilizados por décadas en la producción animal, ya sea como profilaxis o con fines terapéuticos, y en tratamiento de infecciones humanas por lo que su resistencia está ampliamente difundida (Breuil *et al.*, 2000). Bermúdez *et al.* (2013) demostró para las cepas una resistencia mayor al presente estudio para ceftiofur con un 21.94%. En similitud con Nunes *et al.*, (2011) presentan resistencia ceftiofur 62,0% y sulfadiazina 58,0%.

De acuerdo al informe del NARMS (CDC, 2017) la resistencia de *Salmonellas* no tifoideas frente a amoxicilina, ampicilina y ceftiofur están categorizadas por la Organización Mundial de la Salud con importancia crítica, mientras que sulfas, tetraciclina y anfenicoles son de alta importancia. De este modo, en humanos, las principales resistencias dentro de estos grupos se presentan en ceftiofur (2,9%),

ampicilina (9,6%), sulfizoxasole (10%) y tetraciclina (11,5%). Tal como se señaló anteriormente, en el caso de tratar una gastroenteritis por *Salmonella* se recomienda amoxicilina o sulfametoxazol, pero debido a los niveles de aumento de resistencia las recomendaciones se han modificado orientándose a cefalosporinas de amplio espectro o fluoroquinolonas (CDC, 2017). Hoy en día las fluoroquinolonas son antimicrobianos de primera línea para el tratamiento de septicemias por gram-negativos junto a las Cefalosporinas de tercera y cuarta generación han sido los antimicrobianos de elección para el tratamiento de salmonelosis en humanos. Sin embargo, el uso de estas familias de antimicrobianos en veterinaria se extiende para un amplio espectro de bacterias (Karczmarczyk *et al.*, 2013). Los resultados de éste estudio muestran que una muestra de gavota de Franklin fue resistente a ceftiofur, cuya resistencia entre las enterobacterias se relaciona con la resistencia a ceftriaxona, una de las Cefalosporinas de tercera generación usada en niños para el tratamiento de salmonelosis grave (Hur *et al.*, 2011). El monitoreo periódico y continuo de multirresistencias, en especial para estos antimicrobianos clasificados por la Organización Mundial de la Salud como antimicrobianos de importancia crítica, es necesario dentro del marco de construcción de estrategias que mitiguen el impacto de la extensión de las resistencias antimicrobianas, no olvidando que la resistencia frente a éstos no es un fenómeno nuevo, pues ha venido dándose desde hace tres décadas y se ha reportado en varios países.

Los rangos de CMI observados en este estudio superan algunos parámetros indicados por SVARM (2011), como florfenicol en que encontraron un 1% de resistencia mientras que en el presente estudio no se observó resistencia. Para tetraciclina SVARM encontró un 8% de resistencia en comparación al presente estudio que indicó un 100%. Los RIC de las CMI presentados por las cepas analizadas frente a antibióticos como oxitetraciclina fueron bastante amplios, junto a una CMI₉₀ de 512 µg/mL que indica resistencia 64 veces mayor a lo establecido. Las CMI de sulfanamidas SVARM (2011) presenta que 18% resistencia a diferencia de este estudio donde se obtuvo el 100% de resistencias. Las CMI de gentamicina de acuerdo a los datos de SVARM (2011) es de 0% a diferencia de los valores

obtenidos en el presente estudio que fue de 93,93%. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ no necesariamente son predictivos del éxito o falla de una terapia determinada, dado que al ser un estudio *in vitro* puede no tener relación con los resultados clínicos. El uso de la CMI₉₀ para determinar sensibilidad en patógenos puede ser de utilidad, pero es necesario establecer relaciones *in vitro- in vivo* para instaurar usos adecuados de antibióticos. Es por esto que los datos planteados por nuestro estudio pueden ser utilizados sólo como referencia en el uso de los antibióticos testeados.

Aunque existe controversia respecto a si es en el ambiente o en el humano donde se generan primordialmente las cepas resistentes, se reconoce que en ambos se dan condiciones para su aparición y persistencia. Dado que la resistencia se presentó en los aislados de origen animal y alimentarios, este inconveniente ya se encuentra presente en todo nivel. Las consideraciones iniciales como empleo de dosis subterapéuticas de antimicrobianos en la dieta animal con fines profilácticos o para promover su desarrollo, es sólo una de las muchas causales que fomentan la aparición y diseminación de cepas resistentes en el medio ambiente y en la cadena alimentaria (Alaniz *et al.*, 1997). Es decir la teoría del origen de la resistencia sigue apuntando al origen animal que de acuerdo a datos del estudio puede corroborarse en el análisis de MCA aplicado en donde la agrupación de resistencia presentada es estrecha entre aislados de origen animal, por lo que el efecto observado, es decir, mantención y diseminación de cepas explicaría esta cercanía. Junto a esto se suma que existe una amplia variedad de serovares circulantes entre las diferentes especies animales, principalmente en cerdos en donde se detectó 5 diferentes serovares en el presente estudio.

Frente a la detección de genes de resistencia antimicrobiana proporciona la oportunidad de relacionar estas variadas enzimas con su papel clínico, es decir, proporciona una resistencia selectiva a clases de antibióticos o grupos funcionales o a grupos estructurales ayudando al clínico y al microbiólogo del laboratorio a correlacionar las propiedades de una enzima específica con el perfil de la resistencia molecular. En el presente estudio caracterizó un gen para cada grupo antimicrobiano, para las sulfonamidas el gen Sul-1 presentó un 63,6% de

resistencia, similar a lo demostrado por Antune *et al.* (2005), Frank (2007). Debido a que las muestras a través del método de difusión presento un 100% de resistencia, existe la posibilidad de otros genes estén mediando la resistencia. Se han descrito tres genes de resistencia para dihidropteroato sintasas que codifican *sul1*, *sul2* y *sul3*, además de 20 genes de dihidrofolato reductasa (*dhfr*) (Antune *et al.*, 2005; Frank 2007). Ambos grupos de genes están asociados con integrones de clase 1 que residen en plásmidos. Por lo que son genes altamente móviles (Huovinen *et al.*, 1995; Sköld, 2000). Sin embargo, se describe que el integrón de clase 1 In6 e In7 poseen una región conservada común hacia 3' que contiene el gen *qacEδ1* que confiere bajo nivel de resistencias a ciertos compuestos amónicos y *sul1* confiriendo bajo nivel de resistencia a sulfamidas, debido a que no se expresa al haber perdido su promotor (Valentine *et al.*, 1994). Para las sulfonamidas la resistencia es cruzada para esta familia de antimicrobiano, por lo que el surgimiento de nuevas mutaciones puede generar la recombinación entre genotipos o segregación independiente de los cromosomas, dando a lugar a nuevas combinaciones haplotípicas (Antune *et al.*, 2005). Lo que podría generar una restricción sobre la estructura de la enzima para poder unirse al sustrato, debido a sulfonamidas interfieren con la formación de ácido fólico en bacterias, por la inhibición competitiva de la enzima dihidropteroato sintasa. Por lo tanto, los genes de resistencia *sul1*, *sul2* logran diferenciar con particular agudeza a sulfonamida del PABA incluso en concentraciones muy altas de sulfonamida (Sköld, 2001). Las mutaciones más frecuentes en los genes que codifican para la enzima dihidropteroato-sintetasa se presentan en los codones 407, 474, 560 y 597, por lo que es relevante estudiar el polimorfismo genético de los aislamientos y su reestructuración enzimática (Cortes *et al.*, 2000)

Se caracterizó para los beta-lactámicos el gen *Bla_{tem-1}* se presentó en un 54,5% de las cepas muestreadas. Similar a los resultados obtenidos por Ren *et al.* (2017) que identificó un 54,17% de los genes de resistencia para *Bla_{tem-1}* en China. La baja similitud del presente estudio frente a la caracterización de *Bla_{tem-1}* y amoxicilina puede ser debido a que pertenece al grupo 2 B de Bush-Jacoby, es decir, es un gen que se encuentra codificado a nivel plasmídico y son penicilasas inhibidas por

el ácido clavulánico, por lo que pueden generar resistencia cruzada contra ampicilina y cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima, ceftazidima y ceftazidima. Se describe para Bla_{tem-1} que entrega resistencia para Ampicilina (Ren *et al.*, 2016), quizás sea la razón de por qué en el presente estudio amoxicilina tenga un 12,12% de resistencia a diferencia a lo expresado molecularmente en las cepas de *Salmonella enterica*.

Otro gen perteneciente a las β -lactamasas es Bla_{CYM2} presentándose en este estudio con un 45,5% de las cepas muestreadas, sin embargo, la resistencia para ceftiofur fue del 3,03% de las cepas de *Salmonella entérica*. Datos similares demostraron Chalmers *et al.*, (2017) determinó un 58,5% (n= 343) de cepas de *Escherichia coli* el gen Bla_{CYM2} . La importancia de Bla_{CYM2} radica a que es transferible horizontalmente y se encuentra frecuentemente con los aislados resistente a ceftiofur (Dutil *et al.*, 2010). Debido a que ceftiofur es un antimicrobiano ampliamente usado en los animales de abasto, es preocupante su utilización debido a que se genera resistencia cruzada con las partículas de ceftriaxona, cefamicin entre otras cefalosporinas (Dunne *et al.*, 2000; Winokur *et al.*, 2000; Shea *et al.*, 2004). El impacto de la utilización de ceftriaxona en la salud pública es que es la droga de elección para el tratamiento de la salmonelosis grave o invasiva en niños y mujeres embarazadas (Dunne *et al.*, 2000; Fey *et al.*, 2000). La resistencia cruzada de ceftiofur a otras cefalosporina podría ser debido a que Bla_{CYM2} perteneciente al grupo 1C que es un gen que se encuentra codificado a nivel cromosomal o a nivel plasmídico siendo más activos frente a cefalosporinas que a bencilpenicilinas y suelen ser resistente a la acción del ácido clavulánico, por lo que se describe resistencia cruzada frente Cefamicin, cefoxitin y presenta una alta afinidad a aztreonam (Winokur *et al.*, 2000). Cuando se produce grandes cantidades de acúmulos en el hospedador de estos antimicrobianos las enzimas pueden generar resistencia a carbapenemicos modulados por plásmidos que codifiquen a Bla_{CYM} (Winokur *et al.*, 2000). Sin embargo, la importancia de las cefalosporinas de tercera generación han sido clasificadas como antimicrobianos de relevancia critica en medicina humana por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017) debido a que deben de ser administradas en donde las

fluoroquinolonas no están aprobadas y las opciones de tratamiento sean limitadas. De acuerdo a lo publicado por Dutil *et al* (2010) en Canadá los criaderos de aves de Québec ha generado esfuerzo en retirar voluntariamente a ceftiofur durante el 2005-2006 que coincidieron con una prevalencia marcadamente reducida de *Salmonella* Heidelberg resistente a ceftiofur en pollo y a su vez una disminución de las infecciones de *Salmonella* resistente a ceftiofur en humanos durante el mismo periodo. Sin embargo, la reintroducción de ceftiofur en el año 2007 generó que aumentaran la prevalencia frente esta resistencia. Sin embargo, en Chile es necesario generar esfuerzos multidisciplinarios para garantizar la eficacia continua de las cefalosporinas de amplio espectro en los tratamientos de infecciones de alta complejidad de los seres humanos, para evitar la resistencia antimicrobiana de esta molécula. Además de examinar la limitación de utilizar ceftiofur en los alimentos de sistemas de alta salud de los animales de abasto.

El gen del presente estudio que decodifica para las tetraciclinas es tet-A identificado en un 15,2% de las muestras. Sin embargo, por el método de difusión la oxitetraciclina presenta el 57,58% de las muestras. Contrariamente a lo publicado por Ren *et al.* (2017) que identificó un 91,6% del gen tet-A en aislados de cerdos y pollos en China y un 87,5% de resistencia mediante los sensidiscos. Una explicación a la poca similitud entre los porcentaje del presente estudio es debido a que existe una amplia gama de genes que codifican los genes tet-B, tet-C, tet-D, tet-E, tet-I y tet-y, mediante sistemas de eflujo que intercambia un protón por un complejo tetraciclina-catión. Sin embargo, El proceso de resistencia está regulado por 2 genes, uno que codifica una bomba de expulsión activa y el otro una proteína represora, por lo cual, una razón es la presencia del gen tetR que codifica la proteína reguladora de tet-A para su funcionamiento. Por otra parte, existen otros mecanismos de resistencia como protección ribosomal y acción enzimática sobre las tetraciclinas codificados por diferentes genes (Levy *et al.*, 1999; Chopra *et al.*, 2001). El gen tet-A están ampliamente diseminados entre las bacterias gramnegativas y se encuentran normalmente localizados en transposones que a su vez están insertados dentro de plásmidos, lo que les proporciona movilidad y les facilita la diseminación entre diferentes tipos de bacteria. Contrariamente Martí *et al.*

(2006) determinan que gen tet-B codifica la bomba de expulsión más eficaz que tet-A de esta manera proporciona resistencia a tetraciclina y también a minociclina, debido a que ambos genes son determinantes de resistencia a tetraciclinas más ampliamente distribuidos en Enterobacteriaceae (Roberts, 1996).

Las fluoroquinolonas han sido usadas ampliamente en medicina veterinaria. En el presente estudio 21,2% de las muestra presento el gen qnrD para la familia de las quinolonas. Sin embargo, mediante el método de difusión presento un 3,03% de resistencia a enrofloxacino. De acuerdo a los datos de Pribul *et al.* (2017) de la resistencia que se presentó frente a ciprofloxacino, enrofloxacino y Ácido nalixídico se identificó en el gen qnrD. El mecanismo de resistencia a quinolonas está relacionado con la transferencia de genes mediante plásmidos, lo que confiere resistencia horizontal entre comunidades bacterianas. Los genes qnr que codifican a la familia de las proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD) se unen a la ADN girasa (gyrA y gyrB) y a la topoisomerasa IV (parC y parE) disminuyendo la acción de las quinolonas (Cattoir *et al.*, 2008). El aumento de la resistencia a esta familia de antibióticos se puede relacionar con el aumento de CIM hacia diferentes quinolonas, por lo que se genera una “susceptibilidad disminuida”. Sin embargo, el mayor porcentaje de genes qnrD detectado en las cepas de *Salmonella entérica* sobre la expresión fenotípica de enrofloxacino, puede ser debido a que las cepas utilizadas en el estudio sean sensible a antimicrobianos como ciprofloxacino y ácido nalixídico. Por otra parte, integrones de clase 1 que contienen la región común de In6 e In7 llevan un elemento denominado orf513, el cual se postula que codifica una recombinasa específica de sitio para la adquisición de genes de resistencia, inicialmente se conocía el elemento denominado orf341. Sin embargo, en los cassettes el elemento de 59 pb de recombinación se ha perdido, indicando que efectivamente orf513 debe estar implicado en la adquisición específica de sitio de genes (Valentine *et al.*, 1994).

Para los aminoglucósidos se identificó un 15,2% para el gen Aph(3)IIa. De acuerdo con Chen *et al.*, (2004) es un gen que codifica para la resistencia de amikacina a diferencia del gen aacC2 para determinar resistencia a gentamicina. Mediante el

método de difusión se utilizó gentamicina con un 9,09% de resistencia, debido a que describe como un antimicrobiano de uso veterinario (Day *et al.*, 2017).

La propagación de cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes puede atribuirse a la continua transmisión de elementos genéticos entre poblaciones microbianas de las plantas de beneficio y aislamientos nuevos provenientes de la producción primaria, constituyéndose en un riesgo para la inocuidad de los alimentos y para el consumidor.

Dado que el presente estudio es uno de los pocos dedicados a la caracterización de *Salmonella enterica* en el país, entrega una visión de la susceptibilidad antimicrobiana presentada por los aislados de origen animal y alimentario de forma transversal, pero como es un muestreo a conveniencia, es necesario seguir realizando estudios de este patógeno, representativos a nivel poblacional, para ir evaluando la evolución de la resistencia presentada. Junto a esto es importante contar con pruebas basadas en técnicas moleculares para detectar segmentos de ADN que codifican resistencia a fin de aportar mayor información para la caracterización y genotipificación de los aislados de *Salmonella* spp. en nuestro país. Por otra parte, es necesario realizar estudios de caracterización del resistoma en distintos ambientes para conocer los conjuntos de genes que implican sobre la resistencia antimicrobiana, Noyes *et al.*, (2016) describe la caracterización del resistoma en sistemas productivos de bovinos destinado para la industria lechera y cárnica, concluyeron que los resistomas eran distintos entre el suelo, agua de desecho y purines, al igual que los resistomas entre el ganado lechero y cárnico. Sin embargo, el estudio determinó que durante el proceso productivo los resistomas fueron cambiando debido a que en el matadero se aplican intervenciones para reducir contaminación de las carnes y a su vez los genes de resistencia reduciendo los riesgos al consumidor. Por lo tanto, estudio a futuro es analizar el ambiente del genoma para conocer el escenario en que se mueven los genes de resistencia, para así generar conocimientos y prevención, debido a que los elementos genéticos móviles que poseen resistencia antimicrobiana pueden intercambiarse entre microorganismos de distinto género que a su vez pueden poseer distintos tipos de plásmidos que contengan distintos tipos de cassette genéticos y que posean

distintos tipos de transposones que contengan genes de resistencia. Por lo tanto, es necesario generar mayor conocimiento, que amplíen el escenario para mejorar el diagnóstico, la prevención y el control de microorganismos resistente a múltiples antimicrobiano.



VIII. Conclusión

1. Mediante los métodos de dilución y difusión los serovares de *Salmonella enterica* presentaron resistencia al menos a uno de los antimicrobianos utilizados en este estudio como lo son sulfadiazinas, tetraciclinas, amoxicilina, gentamicina, ceftiofur y enrofloxacino, a diferencia de florfenicol que se presentaron susceptible.
2. En los aislados de *Salmonella enterica* se identificaron la amplificación de producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional) para los genes de resistencia antimicrobiana como son: Bla_{CMY2} , Bla_{tem1} , $Aph(3)IIa$, $qnrD$, $Tet(A)$, $Sul1$.
3. El patrón de multirresistencia que se caracterizó fue Bla_{tem1} , $Sul1$ y Bla_{CMY2} entre los distintos serovares de *Salmonella enterica*.
4. Los serovares que presentaron mayor resistencia fueron los aislados del grupo porcino.



IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acar, J.F. and G., Moulin. 2006. Antimicrobial resistance at farm level. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 25 (2): 775-792
2. Adams, P.E., K.J. Varma, T.E. Powers and J.F. Lamendola. 1987. Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in male veals calves given repeated doses. *Am. J. Vet. Res.* 48(12): 1725-1732.
3. Alaniz, R.O., Ibarra, M.L.R., Barbosa, B.T.R. y A.L.J., Morales. 1997. Resistencia a antimicrobianos de cepas de Salmonella aisladas de fuentes animales. *Vet. Méx.* 28:215-220.
4. Amabile, C.F., M.E. Chicurel. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell.* 70: 189-199.
5. Antunes, P., Machado J., Sousa J.C. and Peixe L. 2005. Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese Salmonella enterica Strains and Relation with Integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 49(2): 836–839.
6. Asuquo, A.E. and L.J. Piddock. 1993. Accumulation and killing kinetics of fifteen quinolones for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 31(6): 865- 880.
7. Bahnson, P.B., Fedorka-Cray, P.J., Ladely, S.R. and Mateus-Pinilla N.E. 2006. Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. *Prev. Vet. Med.* 76: 249-262.

8. Bermúdez, P.M. Rincon S.M., Suárez A. 2014. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas del beneficio porcino en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. 32(1): 88-94.
9. Bissonnette, L. and P.H. Roy. 1992. Characterization of $\text{In}0$ of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 1248-1257.
10. Barthel, M., S. Hapfelmeier, L. Quintanilla-Martinez, M. Kremer, M. Rohde, M. Hogardt, K. Pfeffer, H. Rüssmann and W.D. Hardt. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun.* 71 (5): 2839–2858.
11. Brenner, F. W., R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38 (7): 2465-2467.
12. Breuil, J., Brisabois, A., Casin, I., Armand-Lefevre, L., Frémy, S. and E., Collatz. 2000. Antibiotic resistance in salmonellae isolates from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 965-971.
13. Briggs, W.A., S.H. Han, H. Miyakawa, J.F. Burdick, and H.M. Kwon. 1999. Effects of Glucocorticoids and Cyclosporine on IL-2 and I κ B α mRNA Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Clin. Pharmacol.* 39 (2): 119-124.
14. Bown, S.A. 1996. Fluoroquinolones in animal health. *J. vet. Pharmacol Therap.* 19 (1): 1-14.

15. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS). 2017. Quarterly Summary: Salmonella in Agri-food Q1 2010: January- March 2010. Government of Canadá. Updata. En Linea [\[https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports.html\]](https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports.html).
16. Cavaco, L.M., H. Hasman, S. Xia, and F.M. Aarestrup. 2009. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin Antimicrob. Agents Chemother. 53(2): 603-608.
17. Cattoir, V., L. Poirel, and P. Nordmann. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an Escherichia coli isolate from France. Antimicrob. Agents. Chemother. 52 (10):3801–3804.
18. CDC (Center for Disease Control). 2014. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 63(15):328-332.
19. CDC (Center for Disease Control). 1982. Multiresistant *Salmonella* and other infections in adopted infants from India. MMWR (Morb Mortal Wkly Rep) 31: 285- 287.
20. CDC (Center for Disease Control). 2010. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2008. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Service.

21. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard- third edition. 28(8).
22. Chai, S.J., P.L. White, S.L. Lathrop, S.M. Solghan, C. Medus, B.M. McGlinchey, M. Tobin-D'Angelo, R. Marcus, B.E. Mahon. 2012. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis: increasing incidence of domestically acquired infections. Clin. Infect. Dis. 54(5): 488 –497.
23. Chalmers, G., A.C. Cormier, M. Nadeau, G. Côté, R.J. Reid-Smith, P. Boerlin. 2017. Determinants of virulence and of resistance to ceftiofur, gentamicin, and spectinomycin in clinical *Escherichia coli* from broiler chickens in Québec, Canada. Vet. Microbiol. 203: 149-157.
24. Chen, S., S. Zhao, D.G. White, C.M. Schroeder, R. Lu, H. Yang, P.F. McDermott, S. Ayers and J. Meng. 2004. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. Environ. Microbiol. 70(1): 1-7.
25. Chopra, I. and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mo. Bio. Rev. 65(2): 232-260.
26. Clewell, D.B., F.Y. An, B.A. White, and C. Gawron-Burke. 1985. Sex pheromones and plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: a pheromone, cAM373, which is also excreted by *Staphylococcus aureus*. Basic. Life. Sci. 30:489–503.
27. Collis, C.M., G. Grammaticopoulos, J. Briton, H.W. Stokes, R.M. Hall. 1993. Site-specific insertion gene cassettes into integrons. Mol. Microbiol. 9(1): 41- 52.

28. Cona, E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev. Chil. Infect.* 19(2): 77-81.
29. Cortés, L.J., S. Duque, M.C. López, D. Moncada, D. Molina, J.E. Gómez-Marín, M.L. Gunturiz. 2014. Polimorfismos en los genes de dihidrofolato-reductasa (dhfr) y dihidropteroato-sintasa (dhps) y modelado estructural del gen dhps en aislamientos colombianos de *Toxoplasma gondii*. *Biomed.* 34(4): 556-566.
30. Courvalin, P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38(7): 1447-1451.
31. Day, M., M. Doumith, C. Jenkis, T. J. Dallman, K. L. Hopkins, R. Elson, G. Godbole and N. Woodford. 2017. Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 isolated from human cases of diarrhoeal disease in England. *J Antimicrob Chemother.* 72: 145–152.
32. Drlica, K., and X. Zhao. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(3): 377-392.
33. Doublet, B., S. Schwarz, K. Kehrenberg and A. Cloeckaert. 2005. Florefenicol resistance gene *floR* is part of a novel transposon. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49(5): 2206-2108.

34. Doucet-Populaire, F., P. Trieu-Cuot, A. Andremont and P. Courvalin. 1992. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 36(2): 502- 504.
35. Dutil, L., R. Irwin, R. Finley, L. K. Ng, B. Avery, P. Boerlin, A.M. Bourgault, L. Cole, D. Daignault, A. Desruisseau, W. Demczuk, L. Hoang, G. B. Horsman, J. Ismail, F. Jamieson, A. Maki, A. Pacagnella, and D.R. Pillai. 2010. Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg from Chicken Meat and Humans, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 16(1): 48–54.
36. Dunne, E.F., P.D. Fey, P. Kludt, R. Reporter, F. Mostashari, P. Shillam, J. Wicklund, C. Miller, B. Holland, K. Stamey, T.J. Barrett, J.K. Rasheed, F.C. Tenover, E.M. Ribot and F.J. Angulo. 2000. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with ampC beta-lactamase. *J. Am. Med. Assoc.* 284(24): 3151-3156.
37. EFSA. 2008. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. Annexes. *The EFSA Journal* 135: 1-111.
38. Eleni, N. G., D.G. Efsathios, I.D. Agapi, S. Kathariou, G.J.E. Nychas. 2017. Biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on stainless steel under either mono- or dual-species multi-strain conditions and resistance of sessile communities to sub-lethal chemical disinfection. *Food control.* 73: 838-846.

39. Fàbrega, A., and J. Vila. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clin. Microbiol. rev. 26 (2): 308-341.
40. FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition. 1995. Chapter 5. *Salmonella*. En: Food Borne Pathogens Monograph Number 1 *Salmonella*. 1997. Oxoid.
41. FDA Consumer Health Information/U.S. Food and Drug Administration. 2010. En línea: [<http://www.fda.gov/consumers>]
42. Fey, P.D., T.J. Safraneck, M.E. Rupp, E.F. Dunne, E. Ribot, P.C. Iwen, 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. N. Engl. J. Med. 342:1242–1249
43. Foley, S.L. and A.M. Lynne. 2008. Food animals-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. J. Anim. Sci. 86 (14): E173–E187.
44. Frank, T. 2007. Caracterización de los genes de resistencia a sulfonamidas y los casetes de genes de integron clase 1 en Enterobacteriaceae, República Centroafricana (CAR). J. Antimicrob. Chemother. 59(4): 742-745.
45. Fresno, M., V. Barrera, V. Gornall, P. Lillo, N. Paredes, P. Abalos, A. Fernández and P. Retamal. 2013. Identification of diverse *Salmonella* serotypes, virulotypes, and antimicrobial resistance phenotypes in waterfowl from Chile. Vector. Borne. Zoonotic. Dis. 13:884 – 887.

46. Galimand, M., T. Lambert and P. Courvalin. 2005. Emergence and dissemination of a new mechanism of resistance to aminoglycosides in Gram-negative bacteria: 16S rRNA methylation. *Eurosurv. weekly releases* 10 (1). En línea: [<http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050127.asp#2>]
47. Goyache, J., V. Briones. 2002. Géneros *Salmonella* y *Shiguella*. En: Vadillo S, Piriz M. Manual de microbiología veterinaria. Cap 22. Madrid: McGraw-Hill. p 327-338.
48. Hapfelmeier, S. and W.D. Hardt. 2005. A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends. Microbiol.* 13(10): 497–503.
49. Hall, R.M., C.M. Collis. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15(4): 593-600.
50. Heisig, P., B. Kratz, E. Halle, Y. Gräser, M. Altwegg, W. Rabsch, and J.P. Faber. 1995. Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. *Microb. Drug. Resist.* 1(3): 211-218.
51. Helms, M., P. Vastrup, P. Gerner-Smidt and K. Molbak. 2002. Excess mortality associated with antimicrobial drug resistant *Salmonella typhimurium*. *Emerg. Infect. Dis.* 8(5): 490-495.
52. Holmberg, S.D., M.H. Osterholm, K.A. Senger and M.L. Cohen. 1984. Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. *New. Engl. J. Med.* 311(10): 617-622.
53. Huovinen, P., L. Sundström, G. Swedberg, O. Sköld. 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 279-289.

54. Hur, J., C. Jawale and J.H.Lee. 2011., Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: Food. Res. Int. 45(2): 819-830.
55. Huston, C.L., T.E. Wittum, B.C. Love, J.E. Keen. 2002. Prevalence of fecal shedding of *Salmonella* spp in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 220(5): 645–649.
56. Jones, M.E., E. Peters, A.M. Weersink, A. FLUIT, J. Verhoef. 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. Lancet. 349: 1742-1743.
57. Karczmarczyk, M., M. Martins, M. McCusker, S. Mattar, L. Amaral, N. Leonard, F.M. Aarestrup and S. Fanning. 2010. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: Identification of a qnrB19-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. FEMS. Microbiol. Lett. 313(1): 10–19.
58. Levy, S.B. 1986. Ecology of antibiotic resistance determinants. Banbury Report. 24: 17-29.
59. Liu, Y.Y., Y. Wang, T.R. Walsh, L.X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong and X. Huang. 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.
60. Natasi, A. and C. Mammina. 2001. Presence of Class I integrons in multidrug resistant low prevalence *Salmonella* serotypes. Emerg. Infect. Dis. 7 (3): 455-458.

61. NARMS (The National Antimicrobial Resistance Monitoring System) Update September 2017. En Línea. [<https://www.fda.gov/animalveterinary/safetyhealth/antimicrobialresistance/nationalantimicrobialresistancemonitoringsystem/>].
62. Noyes, N.R., X. Yang, L.M. Linke, R.J. Magnuson, S.R. Cook, R. Zaheer, H. Yang, D.R. Woerner, I. Geornaras, J.A. McArt, S.P. Gow, J. Ruiz, K. L. Jones, C.A. Boucher, T.A. McAllister, K.E. Belk and P.S. Morley. 2016. Characterization of the resistome in manure, soil and wastewater from dairy and beef production systems. *Sci. Rep.* 6: 24645
63. Nunes, M.A., D.C. Nunes de Oliveira, D.D. Prazeres and D.R. Coradi. 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in Chicken Carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev. Panam. Salud publica.* 30(6): 555-560.
64. Martí, S., F. Fernández-Cuenca, Á. Pascual, A. Ribera, J. Rodríguez-Baño, G. Bou, J. M. Cisneros, J. Pachón, L. Martínez-Martínez, J. Vila. 2006. Prevalence of the *tetA* and *tetB* genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24:77-80.
65. Mejía, W.J. 2003. Epidemiología de la Salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona
66. Mendez, B., C. Tachibana, and S.B. Levy. 1980. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. *Plasmid.* 3(2): 99–108.

67. ÓhAiseadha, C.O., O.M: Dunne, F. Desmond, O.M. O'Connor. 2009. Salmonella meningitis and septicaemia in a non-immunocompromised adult, associated with a cluster of Salmonella Enteritidis PT 14b, Ireland, November 2009. Euro Surveill 15 (7): 19489.
68. Orden G.J.A. and R. de la Fuente López. 2001. Impact on public health of quinolone resistance in animal-origin bacteria. Rev. Esp. Salud. Pública. 75 (4): 313-320.
69. Papadopoulou, C., Carrique-Mas, J.J., Davies, R.H. and A.R. Sayers. 2009. Retrospective analysis of Salmonella isolates recovered from animal feed in Great Britain. Vet. Rec. 165(23):681-688.
70. Partridge, S.R., G.D. Drecchia, C. Scaramuzzi, C.M. Collis, H.W. Stokes and R.H. Hall. 2000. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. Microbiol. 146(11): 2855-2864.
71. Patton, G., J.A. Scupham, M.D. Shawn, A. Bearson, S.A. Carlson 2009. Characterization of fecal microbiota from a *Salmonella* endemic cattle herd as determined by oligonucleotide fingerprinting of rDNA genes. J. Vet. Mic. 136(3-4): 285–292.
72. Pribul, B. R., M.L. Festivo, M.S. Rodrigues, R.G. Costa, E.C.D.P. Rodrigues, M.M.S.de Souza and D.D.P. Rodrigues. 2017. Characteristics of Quinolone Resistance in Salmonella spp. Isolates from the Food Chain in Brazil. Front. Microbiol. 8: 299.
73. Quinn, P.J., B.K. Markey, F.C. Leonard, M.C. Carter and W.J. Donnelly. 2000. Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias. Acribia. Editorial. 37: 4.

74. Recchia, G.D. and R.M. Hall. 1997. Origins of mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* 5(10): 389-394.
75. Ren, D., P. Chen, Y. Wang, J. Wang, H. Liu and H. Liu. 2016. Phenotypes and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* isolated from retail chicken and pork in Changchun, China. *J. Food Safety.* 37(2).
76. Reset, Resistenzen bei tier uns mensch-gemeinsame forschung in deutschland. 2017. En línea [<http://www.reset-verbund.de/>]
77. Retamal P., M. Fresno, C. Dougnac, S. Gutierrez, V. Gornall, R. Vidal, R. Vernal, M. Pujol, M. Barreto, D. Gonzalez-Acuna and P. Abalos. 2015. Genetic and phenotypic evidence of the *Salmonella enterica* serotype Enteritidis human-animal interface in Chile. *Front. Microbiol.* 6:464.
78. Roberts MC. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS. Microbiol. Rev.* 19: 1-24.
79. Salyers A.A., and C. AMABILE-CUEVAS. 1997. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41(11): 2321-2325.
80. Sastrasinh, M., J.M. Weinberg and H.D. Humes. 1982. Effect of gentamicin on calcium uptake by renal mitochondria. *Life. Sci.* 30(26): 2309- 2315.
81. Sallen, B., A. Rajoharison, S. Desvarenne and C. Mabilat. 1995. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Microb. Drug. Resist.* 1: 195-202.

82. Scallan, E., R.M. Hoekstra, F.J. Angulo, R.V. Tauxe, M.A. Widdowson, S.L. Roy, J.L. Jones and P.M. Griffin. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17 (1): 7 - 15.
83. Shea, K.M. 2004. Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. *J. Pediatr.* 114(3):188.
84. Sköld O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanism and trends, *Drug Res. Updates.* 3:155-160.
85. Sköld O., 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Research. BioMed, Central.* 32 (3-4): 261-273.
86. Smith A.M., H. Ismail, M.M. Henton, K.H. Keddy. 2014. Similarities between *Salmonella* Enteritidis isolated from humans and captive wild animals in South Africa. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8:1615–1619.
87. Stecher, B., G. Paesold, M. Barthel, M. Kremer, J. Jantsch, T. Stallmach, M. Heikewalder and W.D. Hardt. 2006. Chronic *Salmonella* enterica serovar Typhimurium-induced colitis and cholangitis in streptomycin-pretreated Nramp1^{b/b} mice. *Infect. Immun.* 74(9): 5047–5057.
88. Stokes, H.W., R.M. Hall. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3: 1669-83..
89. Sumano, H.S., L. Ocampo. 2006. *Farmacología veterinaria.* (3a. ed.). McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México.
90. SVARM (Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring) 2011. Update 2017. En línea. [http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/trycksaker/svarm2011.pdf].

91. Threlfalla, E.J. 2002. Antimicrobial Drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infection. FEMS Microbiol. Rev. 26: 141-148.
92. Toro M., P. Retamal, S. Ayers, M. Barreto, M. Allard, E. W. Brown, N. Gonzalez-Escalona. 2016. Whole-Genome Sequencing Analysis of Salmonella enterica Serovar Enteritidis Isolates in Chile Provides Insights into Possible Transmission between Gulls, Poultry, and Humans. Appl. Environ. Microbiol. 82(20): 6223-6232.
93. Torres M.C., 2008. aislamiento y sensibilidad antimicrobiana de *salmonella* spp. en cerdos proveniente de planteles animales bajo certificación oficial faenados en la region metropolitana. Memoria de título, Medicina Veterinaria. Universidad de Chile, Escuela de Ciencias Veterinarias. Santiago, Chile.
94. Usera, M.A., Aladueña A., Días R., De La Fuente M., Cerdán P., Gutierrez, R. y A. Echeita. 2003. Análisis de las cepas de Salmonella spp. aisladas de muestras de origen humano en España en el año 2001. Bol Epidem Sem. 11: 133-144.
95. Vadillo, S., S. Píriz, E. Mateos. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana. España, S.A.U., Madrid.
96. Valentine C.R., M.J. Heinrich, S.L. Chissoe, B.A. Roe. 1994. DNA sequence of direct repeats of the *stx* gene of plasmid pSa. Plasmid. 32:222-227.
97. Walther, B., K. Tedin, A. Lübke-Becjer. 2017. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. Vet. Microbiol. 200:71-78.

98. White, D.G., S. Zhao, R. Sudler, S. Ayers., S. Friedman, S. Chen, F.P. McDermott, S. Mcdermott, D.D. Wagner and J. Meng. (2001). The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. N. Engl. J. Med. 345(16): 1147-1154.
99. WHO (World Health Organization) Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use. Report of the second WHO Expert Meeting, Copenhagen, 29–31 May 2007 [cited 2009 Aug 5] Geneva: The Organization; 2007. Available from [\[http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf\]](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf).
100. WHO (World Health Organization) Salmonella (non-typhoidal). Update September 2017. En Linea. [\[http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/\]](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/).
101. WHO (World Health Organization) PLAN DE ACCIÓN MUNDIAL SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS. Update September 2017. En Linea [\[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255204/1/9789243509761-spa.pdf?ua=1\]](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255204/1/9789243509761-spa.pdf?ua=1).
102. Winokur, PL, A. Brueggemann, D.L. DeSalvo, L. Hoffmann, M.D. Apley, E.K. Uhlenhopp, M.A. Pfaller and G,V,Doern. 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC b-lactamase. Antimicrob. Agents. Chemother. 44(10): 2777–83.

103. Yamane, K., J.I. Wachino, Y. Doi, H. Kurokawa and Y. Arakawa. 2005. Global Spread of Multiple Aminoglycoside Resistance Genes. *Emerg. Infect. Dis.* 11(6): 951-953.
104. Yañez, E., S. Mattar y A. Durango. 2008. Determinación de *Salmonella spp.* por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Asociación Colombiana de Infectología.* 12 (4): 246-254.
105. Yue, G.H. and L. Orban. 2001. Rapid Isolation of DNA from Fresh and Preserved Fish Scales for Polymerase Chain Reaction. *Mar. Biotechnol.* 3(3): 199-204.
106. Zamora, J.M., Chavez, C. y M.L. Arias. 2006. Comparación del Perfil de Sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. *ALAN* 56(2).
107. Zatykaa, M., and C.M. Thomasa. 1998. Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS. Microbiol. Rev.* 21(4): 291-319.
108. Zhao, S., D.G. White, S.L. Friedman, A. Glenn, K. Blickenstaff, S.L. Ayers, J.W. Abbott, E. Hall-Robinson and P.F. McDermott. 2008. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Retail Meats, Including Poultry, from 2002 to 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(21): 6656–6662.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Declaro que el trabajo presentado es personal e inédito, que cada una de las citas bibliográficas son correctas y están debidamente reconocidas, que no contiene copias totales ni parciales de otras investigaciones excepto citas aceptadas como trabajos científicos, que no afectan el derecho del autor y que se mantiene dentro del marco ético de trabajos científicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción.

Alex Hernán Espinoza Yarrá

