

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**“CARACTERIZACIÓN DE PERFILES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN
CEPAS DE *Salmonella enterica enterica* DE FAUNA SILVESTRE EN
CAUTIVERIO”**

**Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

ABRIL CORONA CÁRDENAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GABRIELA SILVA HIDALGO

CO-DIRECTOR DE TESIS:

MC. MARTÍN LÓPEZ VALENZUELA

Culiacán Rosales, Sinaloa, México, enero de 2018



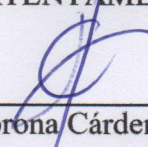
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 23 de enero del año 2018, la que suscribe Abril Corona Cárdenas, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 53130261, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Gabriela Silva Hidalgo y cede los derechos del trabajo titulado “Caracterización de perfiles de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella enterica enterica* de fauna silvestre en cautiverio del estado de Sinaloa”, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE



Abril Corona Cárdenas

CORREO ELECTRÓNICO: abril.coronaa12@gmail.com
CURP: COCA910412MSLRRB06

AGRADECIMIENTOS

Resulta imposible resumir en un pequeño párrafo mis sentimientos de agradecimientos hacia todas las personas que participaron directa o indirectamente en la realización de la presente tesis; así que empezare diciendo;

Dios, te agradezco infinitamente por darme la oportunidad de vivir así poder cumplir cada una de las metas que me he propuesto.

A mis padres, por darme todo el tiempo su apoyo, cariño, amor y paciencia, que es la base para que una persona pueda llegar a ser íntegra, un mejor ser humano, por mostrarme el camino de la perseverancia y que sé que siempre estarán detrás de cada paso que dé en la vida.

A CONACYT, por la confianza puesta en mí a través de la beca otorgada.

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que es como mi segunda casa, donde sé que puedo contar con ella en cualquier momento, a mis profesores que siempre los recordaré, sobre todo a la Dra. Gabriela Silva Hidalgo, mi tutora de tesis de licenciatura y ahora de maestría, que siempre con toda amabilidad y compromiso nos ha asesorado tanto en la vida profesional y personal.

A todos, familia, amigos y doctores que todo el tiempo he podido contar con ustedes y que me han ayudado a ser una mejor persona, los quiero con todo mi corazón, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE CUADROS | III |
| ÍNDICE DE FIGURAS | IV |
| RESÚMEN | V |
| ABSTRACT | VII |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. ANTECEDENTES..... | 2 |
| 2.1 Generalidades..... | 2 |
| 2.2 Signos clínicos y patogenia..... | 2 |
| 2.3 Diagnóstico | 3 |
| 3.1 Sensibilidad frente a agentes antimicrobianos..... | 4 |
| 3.2 Mecanismo de acción de los antibióticos | 5 |
| 3.2.1 Antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana | 6 |
| 3.2.3 Antibióticos inhibidores de la síntesis proteica..... | 7 |
| 3.2.4 Anfencólicos | 8 |
| 3.2.5 Antibióticos que actúan en el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos..... | 8 |
| 3.2.6 Sulfamidas y trimetoprima | 9 |
| 4.1 Consecuencias del uso indiscriminado de antibióticos | 9 |
| 4.1.1 Origen de la resistencia bacteriana..... | 9 |
| 5.1. Resistencia antimicrobiana en cepas de <i>Salmonella</i> spp a nivel mundial..... | 11 |
| 5.1.1. Humanos y animales de producción | 11 |
| 5.1.2 Animales Silvestres y/o Exóticos: <i>Salmonella</i> en fauna silvestre..... | 13 |
| 6.1 Factores que condicionan la diseminación de bacterias resistentes..... | 13 |
| 7.1 Mecanismo de resistencia a los antimicrobianos | 15 |
| 7.2 Métodos de diagnóstico para evaluar la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos | 16 |
| 7.3 Selección de los agentes antimicrobianos | 17 |
| III. HIPÓTESIS | 18 |
| IV. OBJETIVOS | 19 |
| 4.1 Objetivo general | 19 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2 | Objetivo específico..... | 19 |
| V. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 20 |
| 5.2 | Tamaño de la muestra | 20 |
| 5.3 | Reactivación y verificación de pureza de cepas en <i>Salmonella enterica enterica</i> | 22 |
| 5.4 | Prueba de resistencia fenotípica antimicrobiana..... | 22 |
| 5.5 | Prueba de resistencia genotípica antimicrobiana..... | 23 |
| 5.6 | Análisis estadístico..... | 24 |
| VI. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 25 |
| 6.1 | Resistencia fenotípica | 25 |
| 6.2 | Resistencia genotípica | 27 |
| VII. | CONCLUSIÓN..... | 32 |
| VIII. | BIBLIOGRAFÍA..... | 33 |
| IX. | ANEXOS | 38 |
| 9.1 | Principios del método de difusión en agar (Kirby-Bauer) | 38 |
| 9.2 | Interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en agar..... | 39 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Título | Página |
|-----------|--|--------|
| Cuadro 1. | Clasificación de serovares en cepas de <i>Salmonella enterica enterica</i> | 20 |
| Cuadro 2. | Iniciadores utilizados para la detección de genes de resistencia antimicrobiana | 24 |
| Cuadro 3. | Serovares de <i>Salmonella enterica enterica</i> que presentan resistencia antimicrobiana | 25 |
| Cuadro 4. | Resistencia fenotípica antimicrobiana en <i>Salmonella</i> aisladas en fauna silvestre en cautiverio | 26 |
| Cuadro 5. | Resistencia genotípica antimicrobiana en <i>Salmonella</i> aislada en fauna silvestre en cautiverio | 28 |
| Cuadro 6. | Resistencia genotípica-fenotípica al cloranfenicol | 30 |
| Cuadro 7. | Resistencia genotípica- fenotípica a trimetoprima sulfametaxazol | 30 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Título | Página |
|-----------|---|--------|
| Figura 1. | Mecanismos de resistencia antimicrobiana | 15 |
| Figura 2. | Perfil electroforético del gen <i>cmIA</i> | 27 |
| Figura 3. | Perfil electroforético del gen <i>sip B/C</i> | 28 |
| Figura 4. | Caracterización fenotípica en perfiles de resistencia en cepas de <i>Salmonella enterica enterica</i> | 40 |

RESÚMEN

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial y es considerada uno de los problemas más grandes en países desarrollados y en desarrollo, siendo un grave problema de salud pública. Poco se sabe del papel que juegan los animales silvestres en cautiverio como reservorios de *Salmonella*. Algunos autores han asociado dicho género en la morbilidad y mortalidad de animales de zoológico, la probable fuente de infección para estos animales son las frutas y alimentos contaminados por roedores y pequeñas aves nativas que tienen acceso a los albergues. Los animales de producción fungen como reservorio, ya que se mantiene el contacto entre animales y el hombre por el empleo de utensilios contaminados con *Salmonella*. Con la finalidad de determinar la frecuencia fenotípica- genotípica de cuatro genes de resistencia antimicrobiana (*cmIA*, *Sip B/C*, *PSE-1* y *TEM*) del genoma de *Salmonella enterica enterica*, se analizaron 83 cepas aisladas de fauna silvestre en cautiverio del estado de Sinaloa. En el análisis fenotípico de prueba de sensibilidad antimicrobiana se observó que 6/83 cepas (7.2%) mostraron resistencia al cloranfenicol; 0/83 (0%) al trimetoprim-sulfametaxazol y 62/83 (74.69%) mostraron resistencia a la ampicilina. Para el análisis genotípico se realizó la técnica de Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR) donde 16/83 (19.27%) expresaron el gen *cmIA* el cual confiere resistencia al cloranfenicol, 72/83 (86.74%) presentó el gen *Sip B/C* que proporciona resistencia a sulfamidas y el 0/83 (0%) presentó el gen *PSE-1* y *TEM* que provee resistencia a la ampicilina. Fenotípicamente el antibiótico ampicilina mostró mayor resistencia antimicrobiana 62/83 (74.69%) y por lo que respecta a la resistencia antimicrobiana genotípica las sulfas mostraron la mayor frecuencia 72/83 (86.74%).

Palabras clave: *Salmonella*, resistencia antimicrobiana, genes.

ABSTRACT

Salmonellosis is a zoonotic disease of worldwide distribution and is considered one of the biggest problems in developed and developing countries, being a serious public health problem. Little is known about the role that wild animals in captivity plays as reservoirs of *Salmonella*. Some authors have associated this genus in the morbidity and mortality of zoo animals, the probable source of infection for these animals are fruits and food contaminated by rodents and small native birds that access to shelters. The production animals serve as a reservoir, since contact between animals and human is maintained by the use of utensils contaminated with *Salmonella*. With the purpose of determining the phenotype- genotypic frequency of four antimicrobial resistance genes (*cmIA*, *Sip B/C*, *PSE-1* y *TEM*) of *Salmonella enterica enterica*, 83 strains isolated from wild animals in captivity in State of Sinaloa. In the phenotypic analysis of antimicrobial sensitivity test, it was observed that 6/83 (7.2%) were resistance to chloramphenicol; 0/83 (0%) to trimethoprim – sulfamethoxazole and 62/83 (74.69%) known resistance to ampicillin. For the genotype analysis, the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was performed where 16/83 (19.27%) expressed the *cmIA* gene which confers resistance to chloramphenicol, 72/83 (86.74%) presented the *Sip B/C* gene which provides resistance to sulphamides and 0/83 (0%) presented the *PSE-1* and *TEM* gene that provides resistant to ampicillin. Phenotypically ampicillin antibiotic showed greater antimicrobial resistance 62/83 (74.69%) and, as regards genotypic antimicrobial resistance, sulfas showed the highest frequency 72/83 (86.74%).

Key words: *Salmonella*, antimicrobial resistance, genes.

I. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial causada por bacterias del género *Salmonella* y constituye un grave problema de salud pública. El género *Salmonella* consta de solo dos especies, *S. enterica*, la cual está dividida dentro de seis subespecies y *S. bongori* (Popoff, 2003). Son patógenos intracelulares facultativos, gram negativos, de 2 a 4 micrómetros (μm) de longitud, tienen flagelos y fimbrias a excepción de *S. pollorum-gallinarum*, la cual es inmóvil. La infección se adquiere mediante el consumo de agua y/o alimentos contaminados, así como por la manipulación de animales reservorios, ya que se excreta por vía fecal (Uzzau, *et al.*, 2000). Los tipos de enfermedades causadas por estos microorganismos dependen tanto de la especie o serovar, así como del hospedero infectado. Los animales exóticos en cautiverio pueden causar problemas de salud pública, como la gastroenteritis por *Salmonella* spp. La aparición de cepas de *Salmonella* spp con resistencia cromosómica ha causado preocupación en la salud animal y pública debido a que los tratamientos eventualmente carecen de eficacia. Los genes relacionados con dicha resistencia son: *cmIA/tetR*, gen que proporciona resistencia al cloranfenicol; *SipB/C*, confiere resistencia a las sulfonamidas; *PSE-1* y *TEM*, generan resistencia a la ampicilina (Talavara *et al.*, 2011). A partir de cepas de *Salmonella enterica enterica* aisladas del Zoológico Culiacán y del Acuario Mazatlán, se llevaron a cabo pruebas de resistencia fenotípica y genotípica antimicrobiana en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAS. Se determinó la frecuencia de aislamientos bacterianos y las frecuencias de resistencia fenotípica-genotípica, se evaluaron mediante medidas de asociación epidemiológica (RR y OR) con una significancia de $p < 0.05$.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial y es considerada uno de los problemas más grandes en países desarrollados y en desarrollo, siendo un grave problema de salud pública (Abatcha, 2014). Se atribuyen a *Salmonella* 16 millones de casos anuales de fiebre tifoidea, 1.3 millones de casos de gastroenteritis y 3 millones de muertes a nivel mundial (Scallan y Mahon, 2013).

El género *Salmonella* consta de dos especies, *S. enterica*, la cual está dividida dentro de seis subespecies y *S. bongori* (Popoff, 2003). Son patógenos intracelulares facultativos, Gram negativos, de 2 a 4 μm de longitud, poseen flagelos y fimbrias a excepción de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, las cuales son inmóviles, estos microorganismos crecen en un amplio rango de temperatura (7-48°C) a un pH entre 4 y 8 (Uribe, 2006). Se adquiere mediante el consumo de agua y/o alimentos contaminados, así como también por la manipulación de animales que sean reservorios, ya que se excreta en las heces (Uzzau, *et al.*, 2000).

2.2 Signos clínicos y patogenia

Salmonella sp es la enterobacteria de mayor importancia a nivel de salud pública por producir trastornos del tracto gastrointestinal y septicemia no solo en el ser humano, sino en todas las especies animales (Lujan y Blas, 2007). Los microorganismos del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden causar una amplia gama de enfermedades. Todas las salmonelas son potencialmente patógenas, al ser bacterias intracelulares y por medio de los macrófagos en los que se encuentran, se diseminan por todo el organismo afectado aprovechando la vía linfática y sanguínea. Aunado a esto, en medicina humana están descritas diversas presentaciones de salmonelosis: fiebre entérica, septicemia, y finalmente gastroenteritis; mientras tanto, en medicina veterinaria se ha determinado que esta bacteria puede provocar septicemia, enteritis aguda, subaguda y crónica, y abortos en diferentes especies animales (Stanchi, 2007).

Salmonella spp, posee mecanismos que le permiten adherirse a las células epiteliales del intestino delgado y puede sobrevivir al pH ácido del estómago; puede multiplicarse dentro de las células intestinales y liberar una endotoxina, *Salmonella enterica* puede atravesar el epitelio del tracto intestinal, donde causa inflamación y libera una enterotoxina y una endotoxina (INS, 2011).

Las diversas especies de salmonelas se transmiten por contacto tanto con enfermos como con portadores sanos, aunque por lo general la enfermedad producida por este agente microbiano tiene un origen alimentario debido a la ingesta de alimentos contaminados con el patógeno, teniendo en cuenta que la fuente de contaminación ambiental es invariablemente la materia fecal (Stanchi, 2007; CDC, 2007). La mayoría de los serovares aislados de animales y en el hombre pertenecen a *S. enterica* subespecie *enterica* (99.5%), las otras subespecies se asocian principalmente a animales de sangre fría (Evangelopoulou *et al.*, 2013).

2.3. Diagnóstico

Existen diversos métodos de diagnósticos para la determinación de *Salmonella* sp. sin embargo, según la mayor parte de estudios realizados, el cultivo microbiológico es la prueba más comúnmente empleada para el aislamiento de la bacteria a partir de tejidos y heces. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y ser al mismo tiempo simple, rápido y económico. Ningún método cumple con todos los criterios y ninguno es óptimo para todas las condiciones, dado que pueden presentarse alteraciones en los medios de cultivo y algunas pruebas bioquímicas; por lo tanto es recomendable apoyarse también en los nuevos métodos de diagnóstico que están innovando para el aislamiento de *Salmonella* sp mediante el uso de pruebas serológicas y moleculares como ELISA y PCR respectivamente; esta última tiene la capacidad de detectar un pequeño número de organismos del género *Salmonella* (10^2 a 10^4). Estos métodos muestran resultados favorables y confiables en menos tiempo, pero tienen la desventaja de ser costosos (Ward *et al.*, 2005 y Terragno *et al.*, 2003).

3.1 Sensibilidad frente a agentes antimicrobianos

Los antibióticos son compuestos naturales o sintéticos que sirven para combatir infecciones producidas por bacterias, actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos (Martínez y Sánchez, 2007). El uso excesivo de estos medicamentos favorece la selección de bacterias resistentes a diferentes tipos de antibióticos (multiresistentes) (Garza *et al.*, 2009).

La resistencia bacteriana es la capacidad que tiene la bacteria de sobrevivir en presencia de un antibiótico y representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación (Livermore, 2003). Datos recientes indican, que las enfermedades causadas por cepas resistentes pueden ser significativamente más graves comparadas con las enfermedades causadas por las cepas sensibles. La resistencia antimicrobiana conlleva en ocasiones a la necesidad de utilizar antibióticos de amplio espectro o combinaciones de antibióticos para lograr combatir determinadas enfermedades infecciosas, lo que el sistema gastrointestinal tales como alteraciones en las funciones de la microbiota intestinal normal (Martínez y Mesa, 2005).

Los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos se encuadran en cuatro tipos; (1) Inhibición de la síntesis de pared celular, (2) Alteración de la función de la membrana celular, (3) Inhibición de la síntesis o de la función del genoma y (4), Inhibición de la síntesis de proteínas (Prescott, 1988). Sin embargo, el antibiótico ideal empleado con fines terapéuticos, debe reunir una serie de condiciones.

- a. Tener una toxicidad selectiva para el agente infeccioso, lo que implica escasa nula toxicidad para las células del huésped y alta para el patógeno.
- b. Penetrar en los tejidos y las células del organismo para ejercer su acción sobre el agente infeccioso.
- c. Alcanzar la concentración adecuada para ejercer su efecto en el foco de la infección y que se excrete lentamente.
- d. Poseer una acción más bactericida que bacteriostática. Los agentes bactericidas matan a los microorganismos, y los bacteriostáticos inhiben el

desarrollo, interviniendo los mecanismos de defensa del huésped en la erradicación final de la infección.

- e. No alterar los mecanismos de defensa naturales del hospedador (fagocitosis, producción de anticuerpos, entre otros).
- f. No generar aparición rápida de resistencia.
- g. Poseer un amplio espectro de acción sobre los microorganismos que con mayor frecuencia se aíslan.
- h. Permanecer activo en presencia de plasma, líquidos corporales, exudados.
- i. Poseer actividad antibacteriana in vitro.
- j. Ser estable para garantizar un periodo razonable de almacenamiento.
- k. Ser económicamente accesibles.
- l. No producir efectos colaterales indeseables en el huésped (Stanchi, 2007).

3.2 Mecanismo de acción de los antibióticos

Desde el descubrimiento de la penicilina, se han incorporado a la práctica clínica decenas de familias de antimicrobianos, con actividad frente a bacterias, hongos, parásitos y virus.

Con excepción de la pared celular, la práctica totalidad del resto de las moléculas dianas de los antimicrobianos se encuentran también en células eucariotas. Las diferencias estructurales entre las bacterias y las células superiores hacen que la afinidad de los antibióticos de interés clínico por las células dianas procariotas sea mucho mayor que por las de sus homólogas eucariotas, disminuyendo así el riesgo de efectos adversos. Las principales diferencias entre dichas células son que, en las procariotas: a) existencia de un único cromosoma en la bacteria, que no está rodeado de membrana nuclear y se halla en contacto directo con el citoplasma (por lo tanto, muy accesible a los antibióticos que actúan sobre la síntesis de ADN); b) presencia de ribosomas del tipo 70S, y c) presencia de una pared celular con peptidoglicano, estructura que le confiera forma y rigidez a la bacteria (Ruiz y Pastor, 2006).

Para que los antimicrobianos alcancen su diana deben atravesar la cubierta bacteriana, salvo cuando su diana es la propia envoltura externa de los

gramnegativos. Las bacterias gramnegativas ofrecen mayor resistencia que las grampositivas a la entrada de antimicrobianos, pues poseen una membrana externa, que rodea la capa de peptidoglucano. Esa membrana es una bicapa lipídica que, a diferencia de las membranas eucariotas, contiene lipolisacárido, y desempeña un importante papel de barrera frente a determinados antimicrobianos (Nikaido, 2003). Atendiendo a su efecto antibacteriano, los antibióticos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacterioestáticos (sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplasmática o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos (Calvo y Martínez, 2009).

3.2.1. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana. La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta la presión osmótica interna (mayor en las bacterias grampositivas). La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano (Dover *et al.*, 2007).

Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared necesitan para ejercer su acción que la bacteria se encuentre en el medio isotónico o hipotónico, lo que favorece el estallido celular cuando la pared celular se pierde o se destruye. Suelen ser más activos sobre las bacterias grampositivas por su mayor riqueza en peptidoglucano.

3.2.2 β -lactámicos. Representan el grupo más numeroso y de mayor uso en clínica. Son compuestos bactericidas que inhiben las fases finales de la síntesis del peptidoglucano, en la que intervienen activamente las proteínas fijadas de penicilina

(PBP). Las PBP tienen actividad transpeptidasa, transglucosilasa y carboxipeptidasa, por lo que pueden entrelazar los componentes del peptidoglicano. Los β -lactámicos bloquean estas enzimas porque el anillo β -lactámico tiene una estructura espacial similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina de las cadenas de peptidoglicano, que es el sustrato natural de las PBP. Las bacterias poseen varias PBP, cuyas funciones difieren unas de otras. Por esta razón, las consecuencias de bloqueo también son distintas. Las PBP-1a y PBP-1b actúan como transpeptidasas causantes de la elongación, y su bloqueo provoca formación de esferoplastos que rápidamente lisan.

La PBP-2 determina la forma bacteriana, y su inhibición da lugar a formas ovoideas que se lisan fácilmente. La PBP-3 interviene en la división bacteriana, y su bloqueo provoca la aparición de formas filamentosas sin septos. La PBP-4, PBP-5 y PBP-6 tienen actividad carboxipeptidasa, e intervienen en la liberación del quinto aminoácido del pentapéptido, necesaria para la polimerización del peptidoglicano. Pese a tener el mismo mecanismo de acción, hay diferencias en la actividad de los diferentes β -lactámicos, y ello se debe principalmente a 3 factores: rapidez en la difusión de los antibióticos al espacio periplásmico, resistencia a las β -lactamasas, capacidad para escapar a los sistemas de expulsión activa y afinidad variable por las distintas PBP.

La acción bactericida de los β -lactámicos no está relacionada directamente con la inhibición de la síntesis de peptidoglicano impidiendo su crecimiento (efecto bacteriostático), sino con la activación de un sistema de enzimas líticas (autolisinas) que, al contrario de las PBP, que estas implicadas en la degradación del peptidoglicano (Bayles, 2000). El peptidoglicano está en continua renovación, resultante del equilibrio entre los procesos de síntesis (PBP) e hidrolisis (autolisinas a bajo nivel de actividad); la rotura de este equilibrio por la acción de los β -lactámicos (inhibición de las PBP y activación de las autolisinas) provoca la muerte bacteriana.

El espectro de los β -lactámicos abarca las bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas.

3.2.3. Antibióticos inhibidores de la síntesis proteica. La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias

estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S), que contienen ARN ribosómico (ARNr 16S en la subunidad 30S, y ARNr 5S y ARNr 23S en la subunidad 50S) y diversas proteínas llamadas S (*small* o pequeña, en la subunidad 30S) o L (*large* o grande, en la subunidad 50S). En esta estructura diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antimicrobianos. La bactericida o bacteriostática también va a depender de las concentraciones del antimicrobiano, y del microorganismo afectado.

3.2.4. Anfenicoles. El cloranfenicol y su derivado, tiamfenicol, son antibióticos bacteriostáticos que bloquean la síntesis proteica bacteriana uniéndose reversiblemente a la proteína L6 localizada en la subunidad 50S. Esta proteína es la que media la fijación del ARNt a la enzima peptidiltransferasa y por tanto, su bloqueo por el cloranfenicol evita la formación de los enlaces peptídicos.

3.2.5. Antibióticos que actúan en el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos. El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formará parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transferir esta información a su descendencia. La replicación y transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos.

3.2.6. Sulfamidas y trimetoprima. Las sulfamidas y la trimetoprima interfieren en la síntesis de los ácidos nucleicos, ya que las bacterias son incapaces de obtener ácido fólico del entorno, tienen que sintetizarlo. Las sulfamidas y la trimetoprima inhiben esta síntesis, lo cual interfiere en última instancia con la producción de nucleótidos, particularmente la timina. Las sulfamidas son análogas del ácido paraaminobenzoico y actúan como un falso sustrato de la sintetasa de dihidropteroato. El dihidropteroato se convierte en ácido tetrahidrofólico, que es la enzima específicamente inhibida por la trimetoprima. La acción conjunta de sulfamidas y trimetoprima en las bacterias sensibles es sinérgica y resulta en una actividad bactericida (Martínez y Sánchez, 2007).

4.1 Consecuencias del uso indiscriminado de antibióticos

4.1.1 Origen de la resistencia bacteriana. La explicación más clara acerca de cómo surge y se desarrolla el fenómeno de resistencia bacteriana, tiene su sustento básico en las leyes Darwinianas sobre el fenómeno de la selección natural de las especies. En el año 1928, el descubrimiento de Sir Alexander Fleming sobre la actividad antimicrobiana de la penicilina, así como la baja toxicidad de esa sustancia sobre las células animales, este hecho marca el inicio de la era de los antimicrobianos y el comienzo de una desenfrenada carrera para la síntesis de quimioterapéuticos artificiales que determinan en el siglo XX una auténtica revolución médica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, la extrema versatilidad y adaptabilidad de los microorganismos impide que la victoria humana sobre las bacterias patógenas sea total ya que muchas han desarrollado en los últimos decenios mecanismos que las protegen frente a la acción de una gran variedad de estos fármacos. En 1946, Fleming alerta al mundo sobre las consecuencias de este fenómeno expresando: “No existe, probablemente, ninguna droga quimioterapéutica para la cual una bacteria en circunstancias apropiadas no pueda reaccionar por alguna vía adquiriendo resistencia” (Canafi, 2006; Aleskhun y Levy, 2007).

El desarrollo de cada nuevo antimicrobiano, es seguido por la aparición de resistencia al mismo. Es un proceso de evolución normal para los microorganismos,

pero es acelerado por la presión selectiva ejercida por el uso inadecuado y generalizado de estos, tanto en el hombre como en los animales (OMS, 2014). En estos últimos, los fármacos se utilizan con tres finalidades: terapéutica, profiláctica y como promotores del crecimiento. La utilización de los antibióticos como promotores del crecimiento animal constituye una práctica conocida desde la década de 1950, momento en el que se descubre que pequeñas dosis de tetraciclina mejoraban el desarrollo. En aquel momento, se desestimó el efecto que el consumo de estos “factores nutricionales” pudiera tener sobre la resistencia; de esta forma, fármacos como la tetraciclina, la penicilina y el cloranfenicol, medicamentos destinados al tratamiento de infecciones humanas comienzan también a utilizarse con fines de engorde animal, y no es hasta los inicios de la década de los años 70's que surgen las primeras alertas relacionadas con esta práctica, al observarse en *Salmonella* un incremento de la resistencia al cloranfenicol (Witte, 1998; Catry *et al.*, 2003). Además, las cepas resistentes tienen la capacidad de propagarse y diseminarse a otros hospederos.

Es por ello, que la resistencia es en la actualidad una de las principales emergencias que afecta a todas las especies microbianas. La prevalencia creciente de los microorganismos resistentes tiene una notable repercusión en la salud pública porque condiciona el incremento de los índices de morbilidad por infecciones, prolonga la enfermedad y el incremento sustancial de los costos sanitarios. El fenómeno de la resistencia afecta principalmente a las bacterias, y de forma general, a la gran mayoría de los géneros y especies microbianas y parasitarias que pueden ser transferidos al hombre desde el ambiente por diferentes vías. La intensa actividad del metabolismo bacteriano propio del sistema gastrointestinal determina el incremento del intercambio del material genético siendo este, por consiguiente, el lugar de elección para la transferencia a gran escala de genes de resistencia (Puig *et al.*, 2011).

5.1. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp a nivel mundial

5.1.1 Humanos y animales de producción. La salmonelosis constituye un grupo de infecciones producidas por microorganismos del género *Salmonella* spp, caracterizadas por presentar estado febril asociado a manifestaciones gastrointestinales; evacuaciones intestinales líquidas frecuentes, de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre (Saravia, 2008). La manifestación de la enfermedad depende tanto de la capacidad infecciosa del serovar así como la susceptibilidad del huésped ya que son más propensas las personas inmunosuprimidas, lactantes, menores de 6 meses de edad y ancianos (Su y Chiu, 2007).

El reservorio animal se mantiene por contacto entre animales y el hombre por el empleo de utensilios contaminados con *Salmonella*. Algunos serovares presentan especificidad por un hospedero como es el caso de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, que causan enfermedad en el humano y no en otros hospederos; otros serovares como *S. Choleraesuis* están adaptadas a los animales, pero cuando infectan a los humanos pueden causar una grave enfermedad. Otros serovares no muestran especificidad de hospedero y causan enfermedad tanto en el hombre como en animales. La mayoría de las infecciones se presentan por la ingestión de agua o alimentos contaminados (Murray *et al.*, 1998).

Los alimentos, especialmente los de origen animal, constituyen una excelente hábitat para numerosas especies de microorganismos, por poseer condiciones óptimas de humedad, pH, proteínas y grasas para su desarrollo y multiplicación (Mazzio *et al.*, 2016). Un ejemplo de ello es, la carne molida, que es un producto del picado fino que una máquina trituradora realiza a partir de la musculatura de las extremidades y/o grandes masas musculares del ganado vacuno, incluyendo tejido adiposo, epitelial y nervioso (Hedrick *et al.*, 1994). Entre las bacterias patógenas que sobreviven en los alimentos, las de género *Salmonella* están muy difundidas en animales salvajes y domésticos utilizados para la alimentación humana (especialmente aves, porcinos y vacunos). Tales gérmenes pueden contaminar las además alimentarias e invadir establecimientos elaboradores de alimentos (Torres *et al.*, 2013).

Así, la salmonelosis constituye una enfermedad de transmisión alimentaria muy común, que las personas adquieren por el consumo de alimentos provenientes de animales infectados (carne, leche, huevos) de hortalizas contaminadas con materia fecal (Rivas *et al.*, 2011).

En países industrializados, la principal causa es el excesivo uso de antibióticos en las raciones de animales, como promotores de crecimiento, y también el uso indiscriminado de estos medicamentos en humanos y animales, encontrándose una alta proporción de cepas de *Salmonella* spp con resistencia múltiple a los antibióticos (Acha y Szyfres 2001). Yang *et al.* (2001) en Korea, mostró una alta incidencia de resistencia de *S. Enteritidis* a las sulfonamidas (86%), mientras que *S. Typhimurium* mostró resistencia a la estreptomycin, la sulfonamida y las tetraciclinas en 100%, 95.5% y 86.4%, respectivamente. En otro estudio realizado por Zaidi *et al.*, (2006) analizaron 502 muestras de *Salmonella*, encontraron diferentes serovares resistentes a antibióticos orales, como, ampicilina (14.6%), cloranfenicol (14.0%) y a trimetoprim-sulfametaxazol (19.7%) en donde, *S. Agona* y *S. Meleagridis* fueron los serovares más comúnmente aislados de 5 fuentes estudiadas.

En México, se han realizado diversos estudios sobre resistencia a múltiples fármacos como Nayarit *et al.* (2016) donde determinaron el serotipo y perfil de resistencia a antibióticos de cepas de *Salmonella* spp presentes en carne molida de res, expandida en la capital mexicana, donde *S. Lomita* (31.57%) y *Derby* (21.01%) fueron los serovares más predominantes y obtuvieron resultados con un (94%) de resistencia a ampicilina y el (68%) a trimetoprim- sulfametaxazol.

La resistencia antimicrobiana en genotipos de *Salmonella* spp ha sido descrita por Talavara *et al.* (2011) quienes determinaron la presencia de algunos genes relacionados con la resistencia antimicrobiana como lo son: *cmIA/tetR*, el cual proporciona resistencia al cloranfenicol (63.63%); el *SipB/C*, que confiere resistencia a las sulfonamidas (0%); el *PSE-1* (13.33%) y *TEM* (46.66%) los cuales dan resistencia a la ampicilina.

5.1.2 Animales Silvestres y/o Exóticos: *Salmonella* en fauna silvestre.

Poco se sabe del papel que juegan los animales silvestres en cautiverio como reservorios de *Salmonella*. Algunos autores han asociado dicho género en la morbilidad y mortalidad de animales de zoológico, la probable fuente de infección para estos animales son las frutas y alimentos contaminados por roedores y pequeñas aves nativas que tienen acceso a los albergues (Silva *et al.*, 2011). *Salmonella* en poblaciones silvestres es en gran parte desconocida. Muchos animales domésticos y silvestres colonizados por *Salmonella*, albergan la bacteria en sus tractos gastrointestinales con signos no aparentes de la enfermedad (Silva *et al.*, 2013). La naturaleza zoonótica de salmonelosis pudiera también resultar en el intercambio de *Salmonella* spp entre los visitantes del zoológico y fauna en cautiverio, ya que en los zoológicos modernos se permite tocarlos (Neera, 2000). Cabe mencionar que los felinos, por su condición carnívora, presentan un alto riesgo de desarrollar salmonelosis. Es por ello, que se considera que el empleo de dosis subterapéuticas de antimicrobianos en la dieta animal con fines profilácticos o bien la aplicación de tratamientos antibacterianos de corta duración por el complicado manejo de este tipo de animales, es una práctica que fomenta la aparición y diseminación de cepas resistentes en el medio ambiente. Un estudio realizado por Neera *et al.* (2000) en fauna silvestre en cautiverio en Trinidad, señala que durante el periodo 1993-96, 65 aislamientos mostraron resistencia a ampicilina (6.1%), trimetoprim- sulfametaxazol y cloranfenicol (0%).

6.1 Factores que condicionan la diseminación de bacterias resistentes

La resistencia bacteriana tiene una base genética intrínseca y una adquirida (Tello *et al.*, 2011). Resistencia natural; es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico. Y la resistencia adquirida, es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones). Son evolutivas y su frecuencia tiene que ver con el uso de antibióticos (Fernandez *et al.*, 2003).

Los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan dichos genes. Los primeros son fragmentos de DNA bacteriano con longitud variable, algunos con capacidad para replicarse independientemente de la maquinaria genética que dispone la célula. Por otro lado, los transposones son secuencias de DNA (doble cadena) que pueden ser translocados entre cromosomas o bien, de un cromosoma a un plásmido o también, entre plásmidos, esto es posible, gracias a un sistema de recombinación propio que, aunado a la capacidad con la que cuentan los plásmidos para poderse trasladar de una célula a otra durante la conjugación, permitiendo la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas, teniendo como resultado una expansión de resistencia (Livermore, 2012; Mosquito, 2011).

Los integrones son elementos genéticos que permiten capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una cepa multiresistente, estos se se pueden encontrar en algunos plásmidos y transposones (Mosquito, 2011). Los antimicrobianos afectados por este mecanismo son los beta lactámicos, aminoglucosidos, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfamidas.

Las bacterias adquieren la capacidad de resistir la acción de los antibióticos por medio de varios mecanismos como son la modificación de la permeabilidad de la membrana, la extracción del compuesto por mecanismos de bombeo, la inhibición enzimática y la modificación del blanco de ataque o la alteración de la composición y el contenido de glicoproteínas de la pared bacteriana (Llop, 2001).

La resistencia bacteriana se atribuye a un inicio a las mutaciones cromosómicas, hoy se conoce que este fenómeno está más comúnmente asociado a elementos extracromosomales adquiridos a partir de otra bacteria o del medio ambiente (Puig, 2011). Este hecho hace que las bacterias tengan la posibilidad de intercambiar el material genético y con el mismo, resistencias, incrementando la diseminación de los microorganismos con esta característica. De este modo, la transmisión de los factores de resistencia puede dar lugar a un problema mayor, la multiresistencia, condición que implica que dichos microorganismos no sean solamente resistentes a una serie de drogas, sino que esa condición continúe siendo

transferible, transformándose dichas bacterias en verdaderos reservorios para la resistencia de fármacos antimicrobianos (Cires, 2002).

CmlA es una bomba de expulsión activa, descrita en la década de los 80, y ampliamente distribuida en *Salmonellas* y *E. coli* de origen animal, que confiere resistencia a cloranfenicol y que es codificada por el gen de *cmlA*, que a menudo se encuentra ubicado en integrones localizados en plásmidos conjugativos en forma de casetes génicos, que tienen la peculiaridad de contar con su propio promotor y que su expresión sea regulada por atenuación traslacional (Bishoof *et al.*, 2005).

7.1 Mecanismo de resistencia a los antimicrobianos

Existen diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana, pero son 4 los principales:

1.- Modificación enzimática del antibiótico: Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β - lactamasas son las más prevalentes; son proteínas con actividad enzimática capaces de romper enlaces químicos de compuestos β -lactámicos, entre los que se incluyen antibióticos similares a la penicilina.

2.- Bombas de expulsión: Son proteínas transmembranosas que permiten la exportación del antibiótico fuera de la célula tomándolo del espacio periplásmico y con gasto de energético.

3.- Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, ya que pierden porinas, estas son proteínas localizadas en la membrana bacteriana encargadas de transportar sustancias al interior de esta.

4.- Alteraciones del sitio de acción: Tales como mutaciones en la diana específica del antibiótico (ribosomas, lipopolisacáridos, etc.).

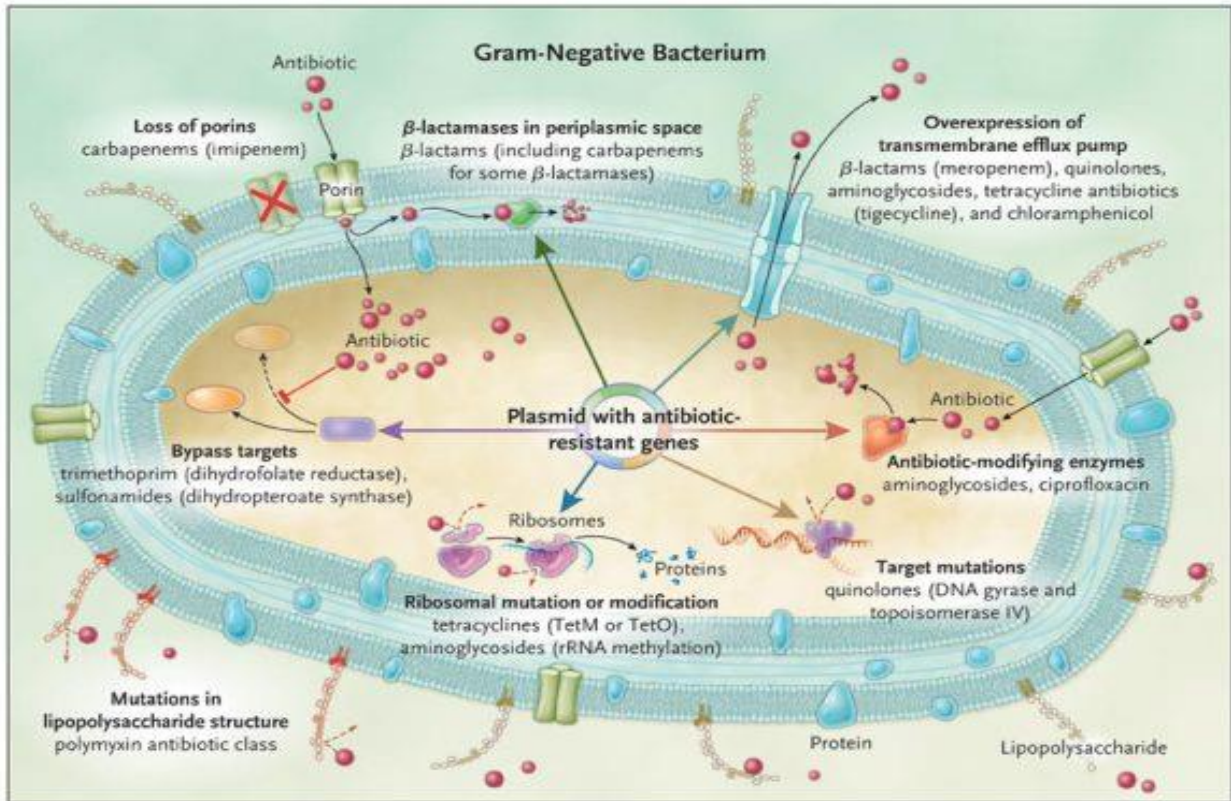


Figura 1. Diferentes mecanismos que poseen las bacterias para resistir a los antibióticos. Los sistemas de resistencia se basan en evitar que el antibiótico acceda a su molécula diana y lo dañe. Como lo son; la pérdida de porinas, β -lactamasas en el espacio periplásmico, bomba de expulsión, enzimas modificadoras de antibióticos, mutaciones genómicas, mutación o modificación ribosomal, mutación en la estructura de lipopolisacaridos. Peleg y Hooper. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. The New England Journal of Medicine. 362:1804-1813.

7.2 Métodos de diagnóstico para evaluar la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos

La aparición de cepas de *Salmonella* spp con resistencia cromosómica ha causado preocupación en la salud animal y pública debido a que los tratamientos ya no tienen el efecto esperado (Talavara *et al.*, 2011). Lo que hace necesaria la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos provenientes de muestras biológicas. Esta se lleva a cabo mediante pruebas in vitro de susceptibilidad, que permiten seleccionar los quimioterapéuticos según la

sensibilidad demostrada por el microorganismo causal (Gentinili *et al.*, 2002). Los métodos empleados, son entre otros, la difusión con monodiscos de antibióticos, método estandarizado por Kirby-Bauer, en el cual se emplea el agar Mueller Hinton, único medio validado por el NCCLS (Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos) para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, dado que existen suficientes datos recopilados que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio (NCCLS, 2009). Después de la incubación, se observa la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento del microorganismo (Escobar, 2004; Stanchi 2007). Estas pruebas están cuidadosamente estandarizadas con el objeto de mejorar el valor predictivo clínico de los resultados.

7.3 Selección de los agentes antimicrobianos

Para la selección de los antimicrobianos a ensayar en las pruebas de sensibilidad se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones: eficacia clínica, prevalencia de resistencia, costo, indicaciones del FDA (Administración de alimentos y Fármacos), recomendaciones consenso para drogas de primera elección y alternativos (Pasteran *et al.*, 2003). Entre los antibióticos con actividad frente a *Salmonella* sp se encuentran:

- Aminopenicilinas (Ampicilina).
- Cloranfenicol (sólo para aislamientos de infección sistémica).
- Tetraciclinas (Tetraciclina)
- Trimetoprim/sulfametoxazol
- Fosfomicina
- Nitrofuranos
- Quinolonas fluoradas (ciprofloxacina o norfloxacina)
- Cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima/ceftriaxona solo para aislamientos de infección sistémica)

III. HIPÓTESIS

Los 17 serovares de *Salmonella enterica enterica* provenientes de fauna en cautiverio, presentan al menos uno de los genes *cmIA/tetR*, *PSE-1*, *TEM*, *Sip B/C*.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar los perfiles de resistencia antimicrobiana de 17 serovares de *Salmonella enterica enterica* aisladas de fauna en cautiverio.

4.2 Objetivo específico

Caracterizar fenotípicamente los perfiles de resistencia antimicrobiana de 17 serovares de *Salmonella enterica enterica* aisladas de fauna en cautiverio en el zoológico de Culiacán y Acuario Mazatlán.

Caracterizar genotípicamente los perfiles de resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella enterica enterica* aisladas de fauna en cautiverio en el zoológico de Culiacán y Acuario Mazatlán.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología (sección Bacteriología y Patología Molecular) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde se realizó un análisis fenotípico y molecular, a partir de cepas de *Salmonella* spp aisladas previamente de albergues, alimento y heces de animales silvestres en cautiverio del zoológico de Culiacán ubicado en las coordenadas geográficas 24° 48' 0" N, 107° 23' 0" O y en el acuario de Mazatlán con 23° 14' 29" N, 106° 24' 35" O del estado de Sinaloa. Se utilizó como control la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium 14028S procedente de la ATCC (American Type Culture Collection).

5.2 Tamaño de la muestra

La investigación se realizó a partir de 83 cepas de *Salmonella enterica enterica* obtenidas del zoológico de Culiacán y acuario de Mazatlán, Sinaloa, clasificadas en 17 serovares (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de serovares en cepas de *Salmonella* aislada en fauna silvestre en cautiverio

| LUGAR | SEROVAR | ALBERGUE |
|-----------|---------|---|
| Zoológico | Albany | <i>Leopardis pardalis</i> , <i>Panthera leo</i> , <i>Felis concolor</i> , <i>Panthera tigris sumatrae</i> , <i>panthera tigris tigris</i> , <i>Lynx rufus</i> , <i>Ursus americanus</i> , <i>Hipopotamus amphibius</i> , <i>Ara macao</i> , <i>Carassius</i> |

| | |
|---------------------------|--|
| | <i>auratus, aquatic birds-feces, aquatic bird-soil, Rattus spp., Periplaneta americana, Musca domestica, pollo crudo</i> |
| O: E2 H:r.- | <i>Hipopotamus amphibius, Bassariscus astutus, heces aves acuáticas, agua aves acuáticas, Cebus paella</i> |
| O: C1 H: en x:- | <i>Hipopotamus amphibius, Crocodylus acutus</i> |
| O: BH: f.g Weltevreden | <i>Columba flavirostris, Columba fasciata, Sus scrofa domestica, heces aves acuáticas, tierra aves acuáticas,</i> |
| Braenderup | <i>Mephitis macroura, Felis concolor, Panthera tigris, Procyon lotor, Ateles geoffroyi</i> |
| San Diego | <i>Heces aves acuáticas, tierra aves acuáticas, Python regius, Python regius, Rattus rattus</i> |
| Oranienburg | <i>Urocyon cinereoargenteus, Saimiri sciureus</i> |
| Derby | <i>Cebus apella, Panthera onca, Panthera tigris,</i> |

| | | |
|---------|-------------|---|
| | | <i>Rattus rattus</i> |
| Acuario | Poona | <i>Psittaciformes</i> birds, <i>Rattus rattus</i> |
| | Saintpaul | Heces aves acuáticas, |
| | Panama | <i>Crocodylus acutus</i> , <i>Rana</i> <i>spp.</i> |
| | Pomona | <i>Ramphastos sulfuratus</i> , Filtro biológico |
| | Newport | Heces aves acuáticas, |
| | Enteriditis | <i>Psittaciformes</i> birds |
| | Javiana | <i>Rana spp.</i> |
| | Give | <i>Iguana iguana</i> |
| | Agona | <i>Ara spp.</i> |
| | sp | Suelo aves acuáticas, <i>Crocodylus acutus</i> |

5.3 Reactivación y verificación de pureza de cepas en *Salmonella enterica enterica*

Las cepas de *Salmonella* se recuperaron del medio de conservación caldo soya-glicerol (50:50) y de condiciones a -20°C. Se transfirieron a caldo soya tripticaseína y se incubaron a 37°C por 18h. Las suspensiones bacterianas obtenidas se sembraron en agar MacConkey para confirmar la reacción negativa de las cepas de *Salmonella* a la lactosa y en agar XLT4 para analizar visualmente la pureza de las cepas de las colonias desarrolladas a 37°C por 24 h. Las cepas confirmadas en agar XLT4 se inocularon en tubo inclinado con medio agar base sangre (BAB) hasta su utilización.

5.4 Prueba de resistencia fenotípica antimicrobiana

Las cepas se sometieron a prueba de resistencia antimicrobiana a través del método Kirby-Bauer bajo normas de Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2009) para verificar susceptibilidad a los siguientes antibióticos: amikacina (AK-30 µm), amoxicilina (AMP-20µm), ampicilina (AM-10µm), cefalotina

(CP-30µm), cefotaxima (CTX-30µm), ceftriaxona (CRO-30 µm), ciprofloxacina (CIP-5µm) cloranfenicol (CL-30µm), dicloxacilina (DC-1µm), eritromicina (E-15µm), kanamicina (KM- 30µm) rifampicina (R- 5µm) trimetoprim/sulfametoxazol (SXT-25/23µm), como control de calidad se utilizará la cepa *S. Typhimurium* ATCC14028S.

5.5 Prueba de resistencia genotípica antimicrobiana

Extracción de ADN bacteriano

A las cepas aisladas se les extrajo el ADN bacteriano. Para dicha extracción se utilizó una matriz comercial (Instagen matrix Biorad®).

Preparación de reacciones

Las secuencias de los iniciadores que se utilizaron se describen en el Cuadro 2.

La reacción consistió en 2.5 µl 10x de amortiguador de PCR, 1.5 µl de 25 mM MgCl₂, 1µl de 200 mM DNTPs, 2 µl de cada *primers* (*SipB/C*, *cmlA/tetR*, *PSE-1*, *TEM*), 1 µl (1 unit/µl) de Taq ADN polimerasa, 3 µl de ADN bacteriano y 13 µl de agua inyectable, las reacciones se sometieron a una preincubación a 95°C por 5 minutos, posteriormente se realizaron 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación de los *primers* a 48°C por 30 segundos y una extensión de ADN a 72°C por 30 segundos. Al finalizar los ciclos, las reacciones se incubaron por 3 minutos a 72°C y posteriormente se bajó la temperatura a 4°C para detener la reacción.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la detección de genes de resistencia por la

| | |
|------------------------------|--|
| <i>SipB/C^a</i> | 5'-ACAGCAAATGCGGATGCTT-3' 5'-GCGCGCTCAGTGTAGGACTC-3' |
| <i>cmlA/tetR^a</i> | 5'-CGCTCCTTCGATCCCGT-3' 5'-GCTGCGTTCATCTACAACAGAT-3' |
| <i>PSE-1^a</i> | 5'-TTTGGTTCCGCGCTATCTG-3' 5'-TACTCCGAGCACCAATCCG-3' |
| <i>TEM^a</i> | 5'-GCACGAGTGGGTTACATCGA-3' 5'-GGTCCTCCGATCGTTGTCAG-3' |

técnica de PCR.

Se tomaron 5 µl de cada reacción y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 3% por 45 minutos a 100 V con 1.5 µl de amortiguador de carga (TBE 1x). Los productos de PCR fueron observados en un fotodocumentador (Bio Rad, Gel Do Ez Imager) .Cada procedimiento se realizó utilizando material estéril y con la inclusión de un control negativo en cada una de las reacciones (Yang *et al.*, 2001).

5.6 Análisis estadístico

El resultado se expresó en porcentaje y se determinó la prevalencia de resistencia antimicrobiana en el lugar de investigación. Además las frecuencias de resistencia fenotípica-genotípica se evaluaron mediante medidas de asociación epidemiológica usando una tabla de contingencia de 2 x 2, con una significancia de P > 0.05, usando el riesgo relativo (RR) y razón de probabilidades (OR).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resistencia fenotípica

Los aislados que mostraron resistencia a tres o más antibióticos pertenecientes a diferentes familias se consideraron multiresistentes. La prueba de sensibilidad a antibióticos mostró que las 83 cepas estudiadas fueron resistentes al menos a 3 fármacos de los 12 utilizados. La frecuencia de resistencia antimicrobiana observada por serovar se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Serovares de *Salmonella enterica enterica* que presentaron resistencia antimicrobiana.

| Antibiótico | Serovar | Serovar (%) |
|----------------|-------------------|-------------|
| Cloranfenicol | Weltevreden | 7.22 |
| Sulfametaxazol | - | 0 |
| Ampicilina | 3, 10, H: r: - | 8.43 |
| | San Diego | 7.22 |
| | Branderup | 7.22 |
| | 6, 7, H: en x: -) | 3.61 |
| | Albany | 33.73 |
| | Oranienburgg | 3.61 |
| | Weltevreden | 7.22 |
| | Javiana | 1.20 |
| | Give | 1.20 |
| | Agona | 1.20 |

La frecuencia de resistencia fenotípica antimicrobiana de los fármacos de interés para nuestro estudio fueron de 62/83 (74.6%) para ampicilina; 6/83 (7.2%) para cloranfenicol, y 0/83 (0%) para trimetoprim sulfametoxazol (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resistencia fenotípica antimicrobiana en Salmonella aislada de fauna silvestre en cautiverio

| Serovar | CL | SXT | AM |
|-------------------|----|-----|----|
| Derby | 0 | 0 | 0 |
| 3,10, H: r: - | 0 | 0 | 7 |
| San Diego | 0 | 0 | 6 |
| Braenderup | 0 | 0 | 6 |
| 6, 7, H: en X: -) | 0 | 0 | 3 |
| Albany | 0 | 0 | 28 |
| Orannienburgg | 0 | 0 | 3 |
| Weltevreden | 6 | 0 | 6 |
| Poona | 0 | 0 | 0 |
| SaintPaul | 0 | 0 | 0 |
| Panama | 0 | 0 | 0 |
| Pomona | 0 | 0 | 0 |
| Newport | 0 | 0 | 0 |
| Enteritidis | 0 | 0 | 0 |
| Sp | 0 | 0 | 0 |
| Jaiviana | 0 | 0 | 1 |
| Give | 0 | 0 | 1 |
| Agona | 0 | 0 | 1 |

| | | | | |
|--------------------------|--|--------------|------|---------------|
| Total | | 6 | 0 | 62 |
| (%) de resistencia | | 7.2 | 0 | 74.6 |
| IC | | 1.66 – 12.80 | 0.00 | 65.35 - 84.05 |

AM, ampicilina; CL, cloranfenicol y SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

6.2 Resistencia genotípica de Salmonella

De las 83 cepas analizadas, 16/83 (19.27%) mostraron un fragmento de 260 pb, correspondiente al gen *cmIA/tetR*; 72/83 (86.74%) presentaron un fragmento de 232 pb, correspondiente al gen *sip B/C* (Figuras 2 y 3). No se observaron los fragmentos de 132 pb y 291 pb, correspondientes a los genes *PSE-1* y *TEM* respectivamente.

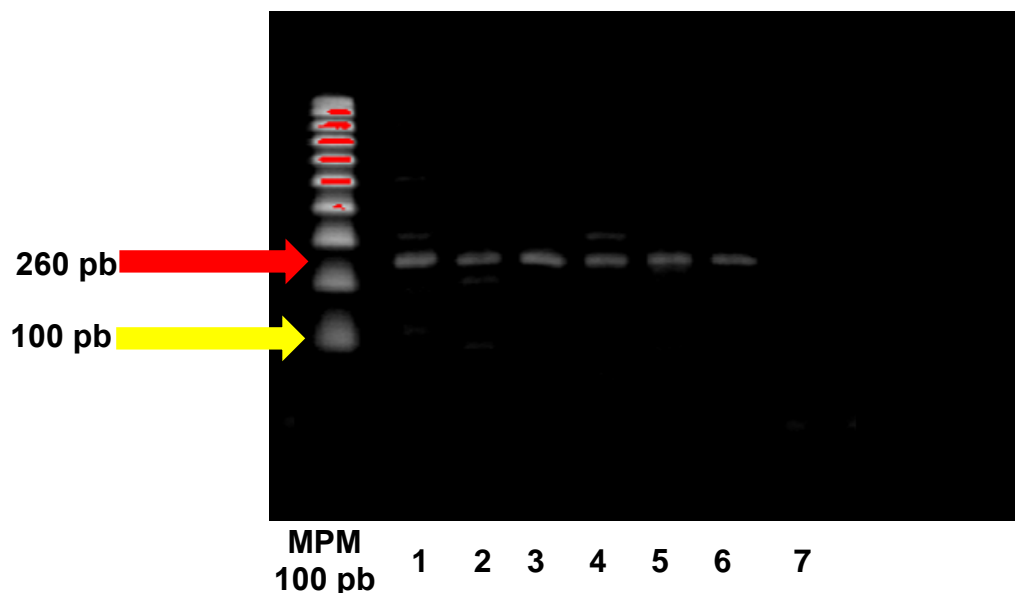


Figura 2. Amplificación de 260 pb del gen *cmIA* de 260 pb, en cepas de *Salmonella enterica enterica*. MPM- Marcador de peso molecular 100 pb. carril 1-6 ADN en cepas de *Salmonella enterica enterica*, carril 7 control negativo.

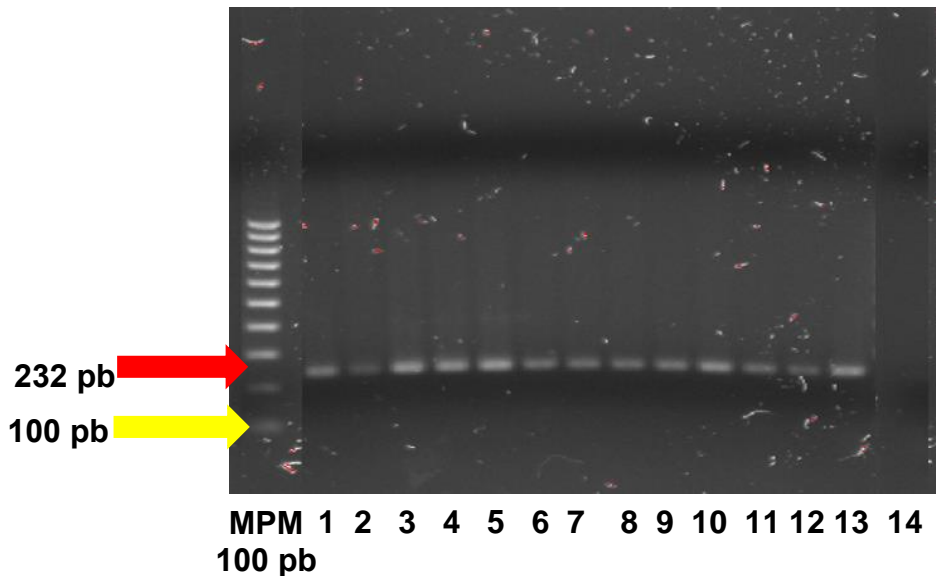


Figura 3. Amplificación de 232 pb del gen *sip B/C*, en cepas de *Salmonella enterica enterica* amplificado por PCR. MPM- Marcador de peso molecular 100 pb. carril 1-13 ADN en cepas de *Salmonella enterica enterica*, carril 14 control negativo.

La frecuencia de resistencia genotípica antimicrobiana de los fármacos de interés para nuestro estudio fueron de 16/83 (19.27%) para el gen *cmIA/tetR*, 72/83 (86.74%) para el gen *sip B/C* y 0/83 (0%) para los genes *PSE-1* y *TEM*.

Cuadro 5. Resistencia genotípica antimicrobiana en *Salmonella* aislada de fauna silvestre en cautiverio.

| Gen | Antibiótico | Frecuencia (%) | IC _{95%} |
|---------------------------|----------------|----------------|-------------------|
| <i>cmIA</i> | Cloranfenicol | 19.27 | 10..79 - 27.77 |
| <i>sip B/C</i> | Sulfametaxazol | 86.74 | 79.46 – 94.04 |
| <i>PSE-1</i> y <i>TEM</i> | Ampicilina | 0 | - |

De las 83 cepas analizadas fenotípicamente ampicilina fue la droga que mostró mayor resistencia (62 muestras o 74.6%), cloranfenicol (6 muestras o 7.2%) y

trimetoprim- sulfametaxazol no presentó resistencia (0 muestras o 0%) (cuadro 1.), de los 17 serovares aislados (cuadro 1.) , *S. Albany* fue el de mayor porcentaje de presentación, en comparación a otros estudios realizados (tabla 2), como es Zaidi *et al.* (2006) analizaron 502 muestras de *Salmonella*, donde diferentes serovares fueron resistentes a antibióticos orales, como, ampicilina (14.6%), cloranfenicol (14.0%) y a trimetoprim- sulfametaxazol (19.7%) y los serovares más comúnmente aislados de las 5 fuentes estudiadas fueron *S. Agona* y *S. Meleagridis*, en comparación a otros estudios realizados, como es el caso de Neera *et al.*, (2000), obtuvieron un (6.1%) de resistencia a ampicilina y un (0%) a trimetoprim-sulfametaxazol y cloranfenicol respectivamente. Sin embargo, todas las cepas de *S. enterica* analizadas en este estudio mostraron multiresistencia antimicrobiana lo cual corresponde a hallazgos de otros que citan que la resistencia a antibióticos es un fenómeno demasiado frecuente.

Ahora bien, el estudio llevado a cabo por Nayarit *et al.*, (2016) se muestra una resistencia a trimetoprim-sulfametaxazol de (68.4%) y un (94.7%) a ampicilina. Llama la atención que el serovar Derby se encuentra en ambos estudio siendo sensible en nuestro trabajo pero resistente en este último.

La multiresistencia ha llegado a ser más común en *Salmonella enterica* similar a salmonelosis no tíficas, que tiene una tasa alta de resistencia a los antibióticos usados tradicionalmente, posiblemente causado por su uso indiscriminado en humanos y animales (Balsalobre y Hernández, 2004).

Las causas asociadas con la resistencia antimicrobiana observadas tanto en el zoológico y acuario fueron multifactoriales. Encontramos que no era inusual por ambos centros que la medicación administrada estuviera basada en diagnósticos incorrectos o en muchos de los casos mal administrados, debido a la dificultad que existe al medicar animales silvestres. Los antimicrobianos no solo atacan a los microorganismos que están produciendo la enfermedad sino que también actúan contra otras poblaciones que son sensibles y viven en el organismo. Esto conlleva a que las cepas resistentes proliferen si no se implementan medidas de control necesarias en los casos de animales que alberguen organismos resistentes a los antimicrobianos.

Los antibióticos son fármacos importantes, tanto en la clínica humana y veterinaria, así como para el bienestar de los animales. Se utilizan en gran medida, las mismas clases de antimicrobianos en animales y en seres humanos. En algunos casos se añaden antibióticos en los piensos y al agua para promover el crecimiento y aumentar la eficiencia alimentaria. Es por ello, que en los estudios realizados por varios autores sobre resistencia antimicrobiana en seres humanos, hay una fuerte relación con los resultados obtenidos en animales de producción.

Cuadro 6. Resistencia genotípica-fenotípica al cloranfenicol, en cepas resistentes y sensibles de *Salmonella enterica enterica*

| Resistente al cloranfenicol | Positivos a <i>cmIA/tetR</i> | Sensibles al cloranfenicol | Positivos a <i>cmIA/tetR</i> |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 6 | 0 (0%) | 77 | 16 (19.27%) |
| RR=0.5809 | | | |
| IC _{95%} (0.0885-3.8112) | | | |
| OR= 0.521 | | | |
| IC _{95%} (0.0599-4.511) | | | |

Cuadro 7. Resistencia genotípica-fenotípica a trimetoprim- sulfametaxazol en cepas resistentes y sensibles de *Salmonella enterica enterica*

| Resistente a trimetoprim sulfametaxazol | Positivos a <i>sip B/C</i> | Sensibles a trimetoprim sulfametaxazol | Positivos a <i>sip B/C</i> |
|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| 0 | 0 (0%) | 83 | 72 (86.74%) |
| RR=0.5764 | | | |
| IC _{95%} (0.1438 - 2.3106) | | | |
| OR= 0.1528 | | | |
| IC _{95%} (0.0089 - 2.6242) | | | |

Hablando genotípicamente se encontró en nuestro trabajo la presencia del gen *cmIA* en un (19.27%) que es relativamente baja en comparación a un estudio que realizó Talavera *et al.* (2011) donde identificó el gen de resistencia; *cmIA/tetR*, con

un (63.63%) en cepas de *Salmonella* spp aisladas de cerdos en rastros del Estado de México, donde el serovar con mayor porcentaje de presentación fue *S. Typhimurium*. El gen *Sip B/C* estuvo presente en un (86.74%) considerándose una tasa alta en comparación al resultado obtenido por Yang *et al.* (2000) con un (40.54%) en *S. enteritidis*. Respecto a los genes *PSE-1* y *TEM* que le confieren resistencia a la ampicilina donde en otros estudios han encontrado un alto porcentaje de presentación de ambos genes en lo cual diferimos en nuestro estudio, ya que no se obtuvieron amplicones, lo cual indica que una de las posibles causas de este fenómeno, se debe a que la resistencia a la ampicilina fue conferida por otros genes de betalactamasa.

VII. CONCLUSIÓN

Con los datos anteriores se puede concluir que en comparación a otros trabajos realizados, en nuestro estudio se obtuvo un bajo porcentaje de amplicones de los genes *cmIA*, *PSE-1* y *TEM*, pero uno alto hablando del gen *sip B/C*. Cabe señalar que a pesar de que todas las cepas analizadas de *Salmonella enterica enterica* fueron sensibles fenotípicamente a sulfas, el (86.74%) presentan el gen, probablemente no hayan sido expuestas al fármaco, pero tienen la posibilidad de llegar a expresar la resistencia fenotípica en un futuro inmediato. Respecto a los genes *PSE-1* y *TEM* que dichas cepas estudiadas no amplificaron, se debe a que la resistencia a la ampicilina fue conferida por otros genes de betalactamasa.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acha, P. y Szyfres, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19161&Itemid. Accesada octubre 15 de 2015.
- Abatcha, M., Zakaria, Z., Kaur, D. y Thong, K. 2014. A trends of Salmonella and antibiotic resistance. *Advances in Life Science and Technology* 14: 9-21.
- Aleskhum, M. y Levy, S. 2007. Another icon of evolution bites the dust-antibiotic resistance. Disponible en: <http://www.uncommonsdescent.com/science/another-icon-of-evolution-bites-the-dust-antibiotic-resistance/>. Accesada diciembre 18 de 2015.
- Balsalobre, H. y Henández, J. 2004. Antibiotic resistances in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* isolated from foods with animal origin. *Review Salud Ambiental*. 4:42-46.
- Bayles, K. 2000. The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends in Microbiology*. 8:613- 622.
- Bischoff, K., White, D., Hume, M. y Nisbet, D. 2005. The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 243: 285-291.
- Calvo, J. y Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Microbiológicas Clínicas*. 27: 44-52.
- Canafi, F. 2006. 30 de octubre de 192, una fecha clave en el diario de Fleming. *Revista Española de Quimioterapia*. 19;395-396.
- Catry, B., Laevens, H., Devriese, L., Opsomer, G. y De Kruif, A. 2003. Antimicrobial resistance in livestock. *Journal Veterinary Pharmacology Therapy*. 26;81-93.
- CDC. 2007. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary. Center for Disease Control and Prevention Department of Health and Human Services. Disponible en <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.html>. Accesada junio 01 de 2016.

- Dover, L., Alderwick, L., Brown, A., Futterer, K. y Bresra, G. 2007. Regulation of cell wall synthesis and growth. *Current Molecular Medicine*.7:247-276.
- Escobar de Rico, M.2004. *Microbiología General*. Primera Edición. Editorial Javegraf. Bogotá. p. 314.
- Evangelopoulou G, Kritas, S., Govaris, A. y Burriel A. 2013. Animal salmonellosis: A brief review of “Host Adaptation and Host Specificity” of *Salmonella* spp. *Veterinary World* 6: 703-708.
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., y Machado, C. 2003. Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 32:44-48
- Gentilini, E., Denamiel, G., Betancour, A., Rebuelto, M., Rodriguez, M. y De Torres, R. 2002. Coagulase –Negative Staphylococci and Mastitis antimicrobial Susceptibility of Coagulase –Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *Journal of dairy science*. 85: 1913-1917.
- Hedrick, H., Aberle, E., Forrest, J. Judge, M. y Merkel, R. 1994. *Principles of meat science*, 3° Ed., Jendall Hunt Publishing Co.
- INS. 2011. Instituto Nacional De Salud. Perfil de riesgo *Salmonella* spp (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. Bogotá D.C. pp 137.
- Livermore, D. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectiology Diseases*. 36:11-23.
- Livermore, D. 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram negative pathogens. *Korean Journal Internal Medicine*. 27:128-142.
- Lujan, M. y Blas, G.2007. *Salmonella*. *Microbiología Veterinaria*. Primera Edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires –República Argentina. 594 p.
- Martínez, C. y Mesa, P. 2005. Prebióticos: ¿Fantasía o realidad?. *Medicina Interna*. 22;53-54.
- Martínez, J., y Sánchez, F. 2007. Mecanismo de acción de los antibióticos. JANO online. Disponible en: <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1660/28/1v0n1660a13108119pdf001.pdf> . Accesada octubre 16 de 2016.

- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. y Ochoa, T. 2011. Mecanismos moleculares de Resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 28:648-656.
- Murray, P., Rossenthal K., Kobayashi, G. y Pfaller, M. 1998. *Salmonella*. Medical Microbiology. 3a ed. Pp: 273-339.
- Muzzio, N., Ulon, S., Merino, L. y Jacobo, R. 2016. Aislamiento de *Salmonella arizonae* en carne molida de una carnicería de Corrientes, Argentina. Revista Veterinaria. 27:2. 134-136.
- Nayarit, N., Rubio, M., Delgado, E., Méndez, D., Braña, D. y Rodas, O. 2016. Perfil de Resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella* spp aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. Salud Pública de México. 58: 371- 376.
- NCCLS. 2009. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. 10 ed. Vol. 29, No. 3. Approved standard M100-S19.
- Neera, V., Abiodun, A. y Kenneth, C. 2000. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. Journal of Diseases, 36; 284-293.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67: 593-656.
- Peleg, A. y Hooper, D. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. The New England Journal of Medicine. 362:1804-1813.
- Pasteran, F; Corso, A y Galas, M. 2003. Manual de Procedimientos Salmonella Parte II. Sensibilidad a los Antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Global Salm–Surv y CDC. Buenos Aires–Argentina.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2014. Antimicrobial resistance global report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en> Accesada enero 29 de 2016.

- Popoff, M., Bockemühl, J., Gheesling, L. 2003. Supplement 2001 no. 45 to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* 154: 173-174.
- Puig, Y., Espino, M. y Leyva V. 2011. Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud*. 6:30-38.
- Rivas, M., Caffer, M., Corso, A., D'Astek, B., Farace, M. y Hoffer, A. 2011. Detección de patógenos asociados a enfermedad diarreica aguda, incluyendo *Vibrio cholerae*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Pp. 490.
- Ruiz, A. y Pastor, A. 2006. Principales grupos de seres vivos con capacidad patógena para el hombre. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid: Editorial Medica-Panamericana. pp. 1-18.
- Saravia, J. 2008. Salmonelosis: Sección de enfermedades infecciosas. Hospital San Juan de Dios. Bogotá., pp 1167-1175
- Scallan, E. y Mahon, B. 2013. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (Food Net) in 2012: A Foundation for Food Safety in the United States. *Clinical Infection Diseases* 57: 779.
- Silva, G., López H., Ortiz, V., Juárez, F. y López, M. 2011. Excreción fecal de *Salmonella* Albany, su aislamiento en la ración alimenticia y repercusión en el estado de salud de un ocelote (*Leopardus pardalis*) en cautiverio. *Veterinaria México*. 43: 59- 69.
- Silva, G., López, H., Ortiz, V., Alpuche, C., Rendón, J., López, J., López, M. y Juárez, F. 2013. Prevalence of *Salmonella enterica* serovar Albany in captive zoo in Mexico. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44; 8-14.
- Stanchi, O. 2007. Microbiología Veterinaria. Primera Edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires – República Argentina. p. 210 –214.
- Su, L. y Chiu, C. 2007 *Salmonella*: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature. *Chang Gung Medical Journal* 30(3):210-219
- Talavara, M., Varela, J.A., Reyes, N.E., Lagunas, S., Valladares, B., Alonso, M.U. y Velázquez, V. 2011. Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella* spp de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México. *Veterinaria México* 42: 269-276.

- Terragno, R., Caffer, M., Bruna, S. y Binztein, N. 2003. Manual de Procedimientos. *Salmonella*: Parte I. Aislamiento, Identificación y Serotipificación. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Global Salm –Surv y CDC. Buenos Aires Argentina.
- Torres, M., Ovono, D., Hugues, B. y Amoro, B. 2013. Incidencia de Salmonella en diferentes tipos de productos cárnicos. Revista Electronica de Veterinaria. 14:11. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> Accesada en noviembre 15 de 2016.
- Uribe, C. y Suárez, M. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Colombia Médica. 37: 152-158.
- Uzzau, S., Brown D.J., Wallis, T., Rubino, S., León, G., Benard, S., Casadesus, J., Platt, D.J. y Olsen, J.E. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enteric*. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 125: 229-255.
- Ward, M., Alinovi, C., Couetil, L. y Wu, C. 2005. Evaluation of a PCR to detect *Salmonella* in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17: 118 –123.
- Witte, W. 1998. Antibiotic use in animal husbandry and resistance development in human infections. *APUA*, 16:1-4.
- Yang SJ, Park KY, Seo KS. 2001. Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* identified by multiplex PCR from animals. *Journal Veterinary Science*. 2: 181-188.
- Zaidi, M., McDermott, P., Fedorka, P., Leon V., Canche, C., Hubert, S., Abbott, J., Leon, M., Zhao, S., Headrick, M. y Tollefson, L. (2006). Nontyphoidal Salmonella form Human Clinical Cases, Asymptomatic Children, and Raw Retail Meats in Yucatan, Mexico. *Clinical Infectious Diseases*. 42: 21-28.

IX. ANEXOS

9.1 Principios del método de difusión en agar (Kirby-Bauer)

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel, pastillas con drogas en estado cristalino, etc.) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión; se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar Mueller Hinton, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, del tamaño del inóculo y la fase de crecimiento de la bacteria, etc., todas estas son las variables más importantes que afectan el resultado del antibiograma. Una vez colocado el disco en la superficie del agar, la difusión del antibiótico que contiene comienza instantáneamente y sigue hasta alcanzarse un gradiente continuo de concentraciones alrededor del reservorio. Este gradiente se alcanza aproximadamente a las 6 hrs. El tamaño de la zona de inhibición dependerá del equilibrio entre la difusión del antibiótico y la velocidad de crecimiento del microorganismo. Las recomendaciones del NCCLS son: colocar los discos dentro de los 15 minutos de inoculada la placa y proceder a la incubación de la misma dentro de los 15 minutos posteriores a la colocación de los discos. Cualquier variación en estos tiempos ocasionará un desplazamiento del equilibrio antes mencionado que se traduce en errores en el tamaño de la zona de inhibición. Como la difusión del disco comienza instantáneamente después de apoyado sobre el agar, estos nunca deben levantarse para cambiarlos de lugar en el antibiograma porque seguramente ya no tendrán la carga de antibiótico original (Pasteran *et al.*, 2003).

9.2 Interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en agar

Para cada antimicrobiano se establecen "concentraciones críticas" o "puntos de corte" que permiten separar a los microorganismos en tres categorías, sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia.

Sensible: Un microorganismo se considera "sensible" a un antibiótico cuando se puede esperar que una infección causada por el mismo responda al tratamiento con dicho fármaco a la dosis recomendada.

Resistente: este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antibiótico en cuestión, cualesquiera que sean la dosis y la localización de la infección.

Sensibilidad Intermedia: Esta categoría se aplica a dos situaciones. Por un lado, se incluyen en ella las cepas con sensibilidad disminuida a un antibiótico que puede utilizarse con éxito, para el tratamiento en dosis más altas, por ser poco tóxico o porque se concentra en el foco de infección (por ejemplo, antibióticos β -lactámicos o quinolonas en la orina). En esta categoría se incluyen asimismo las cepas de "sensibilidad intermedia" a antibióticos que, por ser más tóxicos, no puede usarse en dosis más altas. En este caso, la categoría intermedia sirve como una zona de transición entre las cepas sensibles y las resistentes y previene pequeños errores causados por factores técnicos.

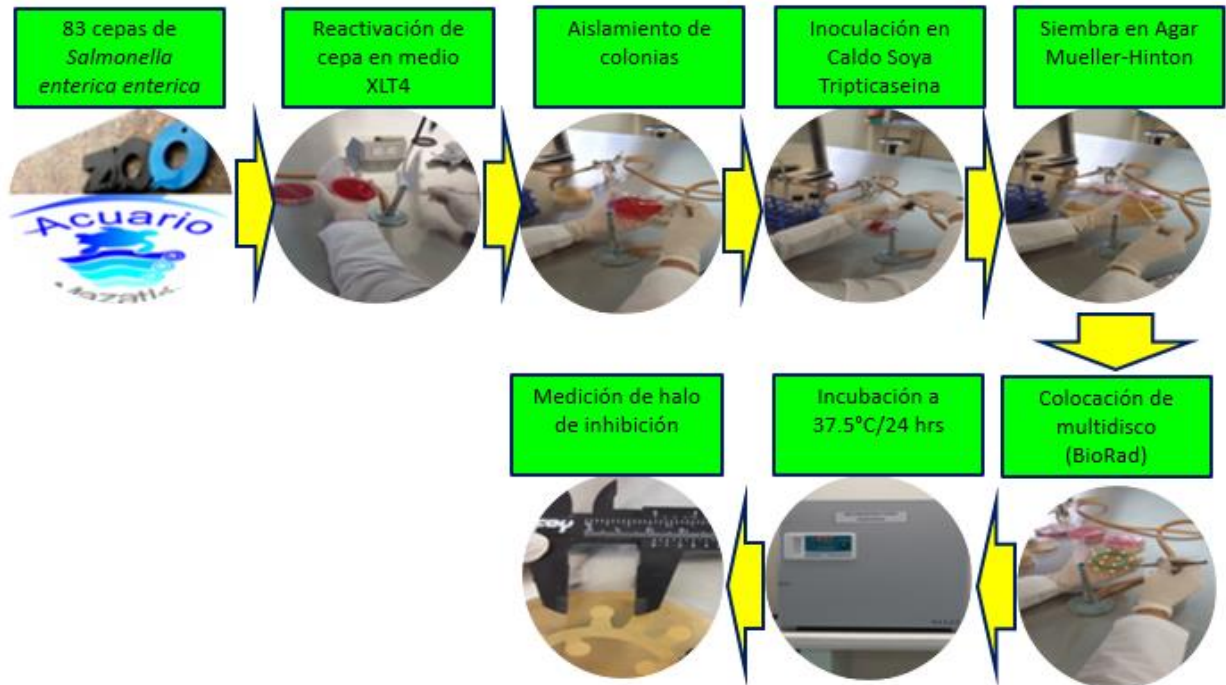


Figura 4. Caracterización fenotípica en perfiles de resistencia en cepas de *Salmonella enterica enterica*. Las 83 muestras de *Salmonella enterica enterica* provenientes de Zoológico Culiacán y Acuario de Mazatlán fueron sometidas a prueba fenotípica, se reactivaron las cepas en su respectivo medio de cultivo, y posterior al crecimiento de *Salmonella*, se realizó el test de resistencia antimicrobiana por medio de multidiscos.