



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Detección de fenotipos de resistencia ACSSuT, BLEE y
AmpC en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de
infecciones animales**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

David Anghelo CENTENO SAUÑE

ASESOR

Sonia CALLE ESPINOZA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Centeno D. Detección de fenotipos de resistencia ACSSuT, BLEE y AmpC en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de infecciones animales [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.



10-R
57 P

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

177

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día martes 23 de mayo de 2017, a las 15:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0123-EPMV/FMV-2017, integrado por los siguientes profesores:

ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Presidente del Jurado
SONIA CALLE ESPINOZA	Asesora de la Tesis
LENIN MATURRANO HERNÁNDEZ	Miembro del Jurado
MORALES CAUTI SIEVER	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **CENTENO SAUÑE, DAVID ANGHELO**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

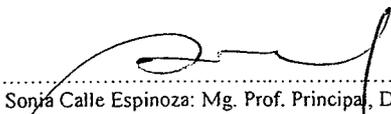
**“DETECCIÓN DE FENOTIPOS DE RESISTENCIA ACSuT, BLEE Y AMPc EN
CEPAS DE *Salmonella entérica* AISLADAS DE INFECCIONES ANIMALES”**,

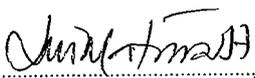
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIESIOCHO (18)**.

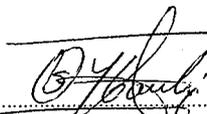
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las 16:15 horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Alberto Manchego Sayán: Mg. Prof. Principal D.E


Sonia Calle Espinoza: Mg. Prof. Principal, D.E.


Abelardo Maturrano Hernández: Dr. Prof. Asociado, T.C


Siever Morales Cauti: MV. Prof. Asociado, T. P

Esta tesis se la dedico a:

*A mi familia, por todo el amor, comprensión
y el gran respaldo que me brindaron durante
todos mis años de estudio.*

*A mis grandes amistades de la universidad,
con los cuales pase momentos invaluables
e inolvidables.*

*A mis maestros de la universidad, los
Cuales supieron encaminarme en el
Camino adecuado.*

AGRADECIMIENTOS

Al fondo de promoción de trabajo de tesis de pregrado del VRI UNSMS (Codigo 150801037), por el financiamiento en la investigación.

A la Dra. Calle, mi directora de tesis, por su constante seguimiento y por darme la oportunidad, confianza y desafiarme en el desarrollo de esta tesis.

A Guillermo Salvatierra, por su apoyo y gran preocupación por haberme transmitido conocimientos, y estar siempre pendiente del desarrollo de la misma, eternamente agradecido.

A André Sedano, por su amistad, por sus consejos y por su apoyo.

ÍNDICE

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	x
I-INTRODUCCIÓN	1
II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1.- Antecedentes	5
2.2.- Características generales	5
2.3.- Factores que afectan el crecimiento y supervivencia	6
2.4.- Estructura antigénica	7
2.5.- Clasificación	7
2.6.- Virulencia	8
2.7.- Cuadro clínico	9
2.8.- Epidemiología	10
2.9.- Resistencia a los antibióticos	12
2.9.1.- El problema de la resistencia bacteriana	12
2.9.2.- Bases bioquímicas de la resistencia	13
Mecanismos de acción	13
Mecanismos de resistencia	14
2.9.3.- Beta-lactámicos	14
2.9.3.1 Estructura química y clasificación	14
2.9.3.2 Mecanismos de acción	15
2.9.3.3 Resistencia	15
Beta-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	16
Betalactamasas tipo AmpC	17
2.9.4.- Quinolonas	19
2.9.4.1 Estructura química y clasificación	19
2.9.4.2 Mecanismo de acción	19
2.9.4.3 Resistencia	20

2.9.5- Mecanismos de resistencia a otros antibióticos	21
2.9.5.1 Resistencia a aminoglucósidos	21
2.9.5.2 Resistencia a fenicoles/cloranfenicoles	22
2.9.5.3 Resistencia a tetraciclina	23
2.9.5.4 Resistencia a sulfamidas y trimetoprim	24
III-MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Diseño del estudio	25
3.2. Descripción y tamaño de muestra	25
3.3. Materiales, equipos y reactivos y Medios de cultivo	26
3.4. Procesamiento de la muestra	26
3.4.1 Reactivación de los aislados	26
3.4.2. Estudios de sensibilidad	27
- Difusión en agar: Método Kirby Bauer	27
- Detección del fenotipo de resistencia ACSSuT (resistencia a tetraciclinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas)	28
- Detección fenotípica de Betalactamasas de espectro extendido (BLEEs)	28
- Detección fenotípica de Betalactamasas tipo AmpC	29
3.5. Análisis de datos	29
IV-RESULTADOS	30
V-DISCUSIÓN	34
VI-CONCLUSIONES	40
VII-LITERATURA CITADA	41
VIII. ANEXO 1: Resultados e interpretación de la prueba de Kirby Bauer	54

RESUMEN

Salmonella enterica es un importante patógeno zoonótico que causa gastroenteritis, transmitida a humanos a través del consumo de alimentos contaminados, principalmente los de origen animal, el uso de antibióticos para fines terapéuticos en la medicina veterinaria y como promotores de crecimiento en los animales destinados a la producción de alimentos, han llevado al surgimiento y diseminación de fenotipos e resistencia de *salmonella enterica*, de esta forma el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de BLEE (Betalactamasas de Espectro Extendido), AmpC (Betalactamasas AmpC) y fenotipos de resistencia ACSSuT (resistencia a oxitetraciclina, ampicilina, estreptomycin, sulfatrimetoprim y cloranfenicol) de aislados de *Salmonella enterica* mediante el uso de la técnica de Kirby Bauer siguiendo las recomendaciones del CLSI y métodos de confirmación apropiados, basados en el uso de inhibidores como ácido clavulánico y cloxacilina. Se utilizaron 50 aislados de *Salmonella enterica* identificados según norma ISO: 6579 (2002) provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se trabajó con un total de 20 antibióticos, de relevancia en medicina humana y veterinaria. Del total de aislados, un 2% (1/50) presentó el fenotipo de resistencia BLEE, un 2% (1/50) de aislados con betalactamasas tipo AmpC, y un 2% (1/50) el fenotipo ACSSuT. Adicionalmente que el 96% (48/50), fueron resistentes a por lo menos un antibiótico. Las frecuencias más altas de resistencia se presentaron al cloranfenicol 94%(47/50), tobramicina 72%(36/50) y oxitetraciclina 49%(31/50). Se observó porcentajes de resistencia bajos en aztreonam 5%, cefalosporinas (2%-7%), sulfatrimetoprim (4%) y gentamicina (2%), una resistencia intermedia a ciprofloxacino (4%) y una sensibilidad del 100% para Amikacina. Los resultados encontrados resaltan la importancia de la información generada por las pruebas de sensibilidad y su uso fundamental en la vigilancia y la detección de patrones de resistencia.

Palabras clave: *Salmonella enterica*, resistencia a antimicrobianos, BLEE, AmpC, ACSSuT, salud pública

ABSTRACT

Salmonella enterica is an important zoonotic pathogen that causes gastroenteritis, transmitted to humans through the consumption of contaminated food, mainly of animal origin, the use of antibiotics for therapeutic purposes in veterinary medicine and as growth promoters in animals destined for (AmpC) (Betalactamasas AmpC) and ACSSuT resistance phenotypes (AmpC (Betalactamasas AmpC)) were used to determine the presence and severity of *salmonella enterica* phenotypes and resistance. Resistance to oxytetracycline, ampicillin, streptomycin, sulfatrimetropim and chloramphenicol) from *Salmonella enterica* isolates using the Kirby Bauer technique following CLSI recommendations and appropriate confirmatory methods based on the use of inhibitors such as clavulanic acid and cloxacillin. Fifty isolates of *Salmonella enterica* were identified according to ISO standard: 6579 (2002) from the laboratory of Microbiology and Parasitology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the National University of San Marcos. We worked with a total of 20 antibiotics, of relevance in human and veterinary medicine. From the total isolates, 2% (1/50) had the BLEE resistance phenotype, 2% (1/50) of isolates with AmpC type betalactamases, and 2% (1/50) of the ACSSuT phenotype. In addition to 96% (48/50), they were resistant to at least one antibiotic. The highest frequencies of resistance were presented to chloramphenicol 94% (47/50), tobramycin 72% (36/50) and oxytetracycline 49% (31/50). Low resistance percentages were observed in aztreonam 5%, cephalosporins (2% -7%), sulfatrimetoprin (4%) and gentamicin (2%), an intermediate resistance to ciprofloxacin (4%) and a 100% sensitivity to Amikacin. The results found highlight the importance of the information generated by the sensitivity tests and their fundamental use in the surveillance and detection of resistance patterns.

Keywords: *Salmonella enterica*, antimicrobial resistance, ESBL, AmpC, ASSuT, public health

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Serovariedades y principales hábitats para las diferentes subespecies de *Salmonella spp.*

Cuadro 2: Principales fuentes de *Salmonella spp.*

Cuadro 3: Esquema de clasificación de Beta-lactamasas.

Cuadro 4: Identificación de las muestras.

Cuadro 5: Antibióticos utilizados en la prueba de Kirby Bauer y puntos de corte considerados.

Cuadro 6: Frecuencia absoluta y relativa de la susceptibilidad de *Salmonella* a los antibióticos.

Cuadro 4: Fenotipos de resistencia

Figura 1: Presencia de fenotipo BLEE

Figura 2: Presencia del fenotipo AmpC, usando el método de inhibidores específicos.

Figura 3: Presencia del fenotipo ACSSuT

Anexo 1: Resultados e interpretación de la prueba de Kirby Bauer.

I-INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia Enterobacteriaceae. Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5um, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*), son anaerobios facultativos, no esporulados (Caffer *et al.*, 2008). Estos microorganismos son conocidos como “patógenos universales”, por tener un amplio rango de hospedadores (D’Aoust y Maurer, 2007).

Los principales reservorios de *Salmonella* son los animales portadores asintomáticos y las fuentes de infección más frecuente son los alimentos o los productos derivados de estos. El aumento de la incidencia de *Salmonella*, es de gran impacto tanto en salud pública como en salud animal y se ha relacionado con un incremento de la diseminación de los microorganismos a través de las cadenas productivas animales (Uribe y Suárez, 2006).

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. La tasa de incidencia de la infección es mayor en los lactantes y en niños de corta edad. Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60-80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternos, geriátricos, restaurantes. Es una enfermedad fundamentalmente de origen alimentario, la fuente frecuente de infección son los alimentos contaminados, incluido agua, también puede ocurrir la transmisión de persona a persona (Caffer M *et al.*, 2008).

La salmonelosis es una de las causas más importante de gastroenteritis en los humanos, con brotes asociados al consumo de productos de origen porcino, bovino y aviar (Baptista *et al.*, 2009) siendo esta infección la décimo tercera más común en el torrente sanguíneo entre el año 1997-2001; con una ocurrencia de 0.4% en Norteamérica a 2.3% en la región Asia-Pacífico (Stephen *et al.*, 2003; Biedenbach *et al.*, 2006).

Las infecciones agudas del tracto intestinal están consideradas como una de las más frecuentes en Colombia (Bustos *et al.*, 2008). Desde el punto de vista productivo, genera pérdidas económicas por concepto de muerte, costos de tratamiento y canales de baja calidad; frente a lo cual se han descrito estudios de costo-beneficio que enfatizan sobre la viabilidad de los programas de prevención/control tanto en granjas como en plantas de beneficio (Goldbach y Alban, 2006; Lawson *et al.*, 2009). Las infecciones por *Salmonella* gastroentéricas cursan con una gastroenteritis autolimitante, de manera que el tratamiento antibiótico solo es requerido en casos graves, en pacientes inmunodeprimidos, con factores predisponentes de riesgo o en edades extremas de la vida. No obstante, es preocupante el incremento de aislados de *Salmonella enterica* resistentes a algunos de los antibióticos utilizados para el tratamiento empírico, en particular amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas. La resistencia a B-lactámicos en *S. enterica* se debe principalmente a la adquisición de enzimas B-lactamasas más frecuentemente relacionadas con la resistencia a ampicilina y amoxicilina con ácido clavulánico (Guerra *et al.*, 2004 y De Toro *et al.*, 2011).

La producción de enzimas constituye el principal mecanismo de resistencia a los β -lactámicos en bacterias gramnegativas (Navarro *et al.*, 2002 y Marín, 2003). A partir de la detección en 1983 de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación que, posteriormente, resultaron ser productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), ha sido significativo el avance en cuanto a la caracterización de estas enzimas (Perozo y Castellano, 2005). Existen muchos métodos para la detección de la producción de enzimas, mediante la manifestación de fenotipos de resistencia, entre ellos se destaca las aplicaciones de Kirby Bauer (Jacoby, 2009 y CLSI, 2012).

EL incremento de *Salmonella enterica* multirresistente a los antibióticos, incluidos B-lactámicos y fluoroquinolonas, es un problema de importancia clínica. La propagación de *Salmonella* resistente a ampicilina-cloranfenicol-estreptomicina-sulfanamidas-tetraciclinas portadoras de la Isla genómica de *Salmonella* de tipo 1 (SGI1) y la captación de material genético transferible ha favorecido la multirresistencia en este género (De Toro *et al.*, 2012).

La aparición y propagación de las bacterias que producen las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se han descrito en todo el mundo como punto crítico de urgencia debido a la alta propagación de estas cepas en diferentes tipos de infecciones, y que los estudios demuestran que se presenta mayormente en las Enterobacteriáceas y confieren resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenemes ni a las cefamicinas, además la mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico. Por ello las BLEE son un problema de salud pública con proporciones alarmantes de prevalencia en Latinoamérica que alcanza tasas preocupantes en Colombia, Guatemala, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil (Winokur *et al.*, 2001; Máttar y Martínez, 2007). En el Perú no se cuenta con suficiente información de la real prevalencia de la resistencia antimicrobiana mediada por BLEE en enterobacteriáceas debido a la falta de estudios y a la dificultad técnica para su detección (Lezameta *et al.*, 2010).

La presencia de β lactamasas tipo AmpC en enterobacterias es de gran importancia, ya que están asociadas a fracasos terapéuticos y, a nivel de laboratorio, con falsos reportes de susceptibilidad antimicrobiana, muchos laboratorios no determinan la presencia de AmpC debido, a que se requieren reactivos no disponibles de manera rutinaria en el laboratorio clínico, por lo que es importante su investigación empleando métodos de detección fenotípicas y haciendo lectura interpretada del antibiograma. La detección también es importante para el monitoreo de bacterias con AmpC natural que durante el tratamiento con cefalosporinas se tornan resistentes, o en casos de cepas productoras de BLEE conjuntamente con AmpC (Martínez *et al.*, 2009).

El objetivo del estudio fue determinar la presencia fenotipos de resistencia, tales como, ACCSuT (resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, fenicoles, tetraciclinas y sulfamidas), BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) y AmpC (β -lactamasas tipo AmpC) de 50 aislados de *Salmonella enterica* provenientes de diversas especies de animales domésticos, frente a diversos antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo, por tal motivo es importante conocer a detalle a las diversas familias de antibióticos (β -lactámicos, aminoglucósidos, fenicoles/cloranfenicol, quinolonas/fluoroquinolonas, tetraciclinas, trimetoprim y sulfamidas), así lograremos comprender los mecanismos de resistencia que presenta esta bacteria frente a los antibióticos mas representativos de cada familia, a fin de generar conocimientos sobre la magnitud y distribución de este tipo de bacterias resistentes y contribuir en la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos.

II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- ANTECEDENTES

El nombre *Salmonella*, se debe al veterinario y bacteriólogo Daniel Elmer Salmon, quien con ayuda de Theobald Smith, aislaron la primera *Salmonella* a partir de intestino de un porcino en 1885, inicialmente considerándolo como agente causal de la Peste Porcina Clásica (PPC). *Salmonella choleraesuis* (actualmente *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Choleraesuis), fue la cepa aislada, sin embargo, esta se consideró como una bacteria oportunista en cerdos inmunosuprimidos por agentes infecciosos tales como el virus de la PPC (Schwartz, 1991).

2.2.- CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El género *Salmonella* está incluido en la familia Enterobacteriaceae, Orden *Enterobacteriales*, Clase Gamaproteobacteria (Garrity *et al.*, 2004). Los miembros de esta familia se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, no esporulados, anaerobios facultativos con un contenido de guanina-citosina (GC) de 50-53% y móviles por flagelación peritrica, a excepción de los serotipos Gallinarum y Pullorum, además de alguna variante inmóvil de otros serotipos como arizonae (Corral y Perea, 1992).

No fermentan la lactosa (excepto *Salmonella arizonae* y *Salmonella diarizonae*), fermentan glucosa con producción de gas (excepto *Salmonella* Thypi), la mayoría producen H₂S, son oxidasa negativos, catalasa positivos, indol, urea y voges proskauer negativos, citrato de simmons positivo, descarboxilan la lisina y la ornitina. Se encuentran como comensales o patógenos, la mayoría son patógenos para los humanos, sin embargo, pueden ser patógenos para otros hospedadores como mamíferos, aves, reptiles, anfibios e incluso plantas por lo que son conocidos como “patógenos universales”, por su amplio rango de hospedadores (Edwards y Edwing, 1972; Grimont y Weill, 2007; Caffer *et al.*, 2008).

2.3.- FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

Posee una temperatura óptima de crecimiento de 35 - 43°C, siendo la temperatura mínima de crecimiento importante en los alimentos refrigerados. El ritmo de crecimiento de *Salmonella* se reduce sustancialmente a temperaturas inferiores a 15°C, mientras que el crecimiento de la mayoría está inhibido a temperaturas inferiores a los 7° C (ICMSF, 1998).

A temperaturas bajas, la muerte de *Salmonella* es mayor durante el proceso de congelación que durante el tiempo que puede permanecer congelado un alimento. El descenso de la viabilidad de las *Salmonella* es mucho mayor en el intervalo de temperaturas entre 0°C y -10°C que entre el de -17°C a -20°C (ICMSF, 1998). Por otro lado, cuando se sobrepasa la temperatura máxima de crecimiento (47°C) sobreviene la muerte. La tasa de muerte aumenta a medida que aumenta la temperatura. La temperatura máxima de crecimiento es importante como valor por encima del cual deben de ser mantenidos los alimentos almacenados calientes para impedir el crecimiento de *Salmonella*. Si bien serían suficientes 55°C, en las disposiciones con frecuencia especifican 63°C (Forsythe, 2003).

Por lo general, la *Salmonella* puede ser fácilmente destruida por una pasteurización y suele bastar una media hora de tratamiento térmico a 60°C para inactivarlas, temperatura que debe alcanzar el centro de masa del producto (carnes, pollos, pasteles, etc.). Así mismo, cuando la temperatura se eleva hasta los 72°C pueden bastar solamente 15 segundos para su destrucción, aunque la eficacia térmica va a depender del serotipo. Sin embargo, cuando se trata de alimentos deshidratados se necesitan tratamientos más intensos porque bajo estas condiciones las células presentan una mayor fortaleza frente a los tratamientos térmicos (Bello *et al.*, 2000). La evidencia más reciente indica que la exposición prolongada de cepas mesófilas a condiciones de estrés térmico se traduce en mutantes capaces de crecer a 54°C (Doyle *et al.*, 2001).

Es capaz de crecer en medios aerobios y anaerobios inactivándose por la luz, desinfectantes comunes y su supervivencia disminuye a pH ácido (Coma, 2001). El pH óptimo de crecimiento es de 6,5-7,5; soportando un rango entre 4,5-9. Se desarrollan bien a una actividad de agua (A_w) de 0,945 a 0,999, aunque en valores muy bajos que se encuentran en productos deshidratados, sobreviven largos periodos de tiempo (Gledel, 1995; Mossel *et al.*, 2002). La supervivencia de esta bacteria variará en función del tipo de ácido presente: el ácido cítrico apenas les afecta, pero en medio acético con pH 4,0 pueden ser destruidas en pocas horas (Bello *et al.*, 2000).

Tratamientos de alta presión hidrostática inactivan a *Salmonella*, siendo bastantes resistentes a la acción de nitritos y de la sal (Garriga *et al.*, 2003). Cabe destacar la alta tolerancia de *Salmonella* frente a sales biliares y la presencia de colorantes (azul de metileno, eosina, fucsina ácida, cristal de violeta o verde brillante), lo que ha sido utilizado para el diseño de medios de cultivo como agar Hektoen, agar verde brillante o el agar eosina-azul de metileno (Gledel, 1995; Mossel *et al.*, 2002).

2.4.- ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

La estructura antigénica de *Salmonella* spp. es muy parecida a la de otras enterobacterias, presenta: Antígeno O, Antígeno H y Antígeno Vi (Parra *et al.*, 2002). La envoltura externa de las bacterias del género *Salmonella* está compuesta por 3 capas: la membrana interna, la pared de peptidoglucano y la membrana externa (Brock, 1999). Ésta última, ampliamente estudiada está compuesta por fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS) y proteínas. El LPS está compuesto de un lípido A embebido en la membrana externa, una región central, y una región antigénica O.

2.5.- CLASIFICACIÓN

A lo largo de los años, los nombres dados a *Salmonella* no han seguido las normas usuales de la nomenclatura. La clasificación actual de *Salmonella* es extremadamente compleja. Su caracterización da como resultado la división del género en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* se subdivide en 6 subespecies basándose en las diferencias bioquímicas (Cuadro 1).

El género *Salmonella* está a su vez, dividido por serología en más de 2579 serovares, mediante el esquema de Kauffman-White. Esta clasificación define al serogrupo de acuerdo a la expresión del antígeno somático O del LPS, y al serovar por la expresión del antígeno flagelar H. Las diferentes combinaciones entre los 46 antígenos O y 114 antígenos H descritos, permite reconocer los diferentes serotipos. Este método ha sido de gran utilidad para comprender la epidemiología de este patógeno (Tillier y Collins, 2000; McQuinston *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Serovariedades y principales hábitats para las diferentes subespecies de *Salmonella* spp. (Grimont y Weill, 2007).

Especies	Subespecies	N° de Serovariedades	Principales hábitats
	subesp. <i>enterica</i> (I)	1531	<i>Animales de sangre caliente</i>
	subesp. <i>salamae</i> (II)	505	<i>Animales de sangre caliente / fría y ambiente</i>
<i>Salmonella</i>	subesp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	<i>Animales de sangre fría y ambiente</i>
<i>enterica</i>	subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	<i>Animales de sangre fría y ambiente</i>
	subesp. <i>houtenae</i> (IV)	73	<i>Animales de sangre fría y ambiente</i>
	subesp. <i>indica</i> (VI)	13	<i>Animales de sangre fría y ambiente</i>
<i>Salmonella bongori</i> (antes			
Subespecie V)		22	<i>Animales de sangre fría y ambiente</i>
Total		2579	

2.6.- VIRULENCIA

La estrategia patogénica de *Salmonella enterica* es muy compleja e incluye la penetración de la barrera intestinal y la interacción con las células del sistema inmune donde actúa como patógeno intracelular (De Toro, 2013).

Tras la ingestión de *Salmonella*, cuya dosis infectiva es 10^5 - 10^6 , las bacterias alcanzan el estómago donde se unen a los jugos gástricos y a un pH muy ácido. Aquellas bacterias capaces de sobrevivir a estas condiciones, así como a los mecanismos defensivos propios de nuestro organismo pueden llegar a colonizar el íleon y/o colon e invadir el epitelio.

Esta invasión puede ser pasiva (facilitadas por células dentríticas de las Placas de Peyer que emiten pseudópodos) o bien activa (unión a receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora, seguida de una internalización tanto en los enterocitos como en las células M, ambas capaces de absorber antígenos de superficie presentes en el lumen). La invasión activa requiere que *Salmonella* inyecte sobre la célula hospedadora, unas proteínas efectoras, utilizando un sistema de secreción de tipo III (T3SS-1) codificado en la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* de tipo I (SPI-1) (Schlumberger Hardt, 2006; Ly y Casanova, 2007 y McGhie *et al.*, 2009).

Una vez en el interior celular, *Salmonella* es capturada por células fagocíticas, tales como macrófagos que transportan a la bacteria hacia el sistema linfático y pueden facilitar su dispersión hacia el hígado, bazo o nódulos linfáticos. La persistencia de la bacteria en el interior de este tipo de células se debe a que la *Salmonella* es capaz de crear una vacuola conocida como “Vacuola de Contención de *Salmonella*” (SCV), que permite su supervivencia y replicación en el interior de los macrófagos. Esta etapa requiere la expresión de otro sistema de secreción tipo II (T3SS-2), codificado en la Isla de Patogenicidad de tipo 2 (SPI-2), que permite la secreción de efectores de virulencia desde la vacuola al citoplasma celular del hospedador. Aunque se sabe que *Salmonella* puede provocar en este estadio una segregación de citoquinas que median en la inflamación epitelial (provocando el fenómeno de diarreas) e incluso una apoptosis de las células que la contienen, hasta el momento no quedan claros los mecanismos por los cuales la bacteria abandona la célula hospedera y continua infectando a otras células (Schlumberger Hardt, 2006; Ly y Casanova, 2007; McGhie *et al.*, 2009).

Tal y como se ha descrito, el mecanismo de invasión de *Salmonella* es complejo y requiere de un gran número de factores de virulencia, entre los que destacan dos grupos generales: las estructuras superficiales de la bacteria y los genes de virulencia, localizados tanto en plásmido como en cromosoma.

2.7.- CUADRO CLÍNICO

Es un patógeno intracelular facultativo que dependiendo del serotipo y del hospedador puede presentar tres maneras de manifestarse: la bacteria puede ser eliminada del organismo gracias al sistema inmune del hospedador, o puede mantenerse en el organismo dando lugar a un estado de portador asintomático; o bien, puede ocasionar distintos cuadros clínicos: infección intestinal, septicemia, fiebre entérica (De Toro, 2013).

2.8.- EPIDEMIOLOGÍA

Salmonella spp., es por detrás de *Campylobacter spp.*, el patógeno zoonótico mas importante nivel mundial, provocando millones de casos de gastroenteritis cada año, tanto en países en vías de desarrollo como en países industrializados.

Las tasas más altas de salmonelosis se dan entre los grupos de edad de 0-4 años (113 casos por cada 100 000 habitantes) y de 5-14 años (35 casos por cada 100 000 habitantes), aunque no se observan diferencias en cuanto al sexo de los pacientes. Se estima que un 60% de las infecciones por *salmonella* son adquiridas en el ámbito doméstico, a través del consumo de alimentos contaminados. Asimismo, aproximadamente el 65% de estos casos tiene relación con el consumo de ovo-productos, consumo de carne de cerdo (28% de los casos), pavo (4,5%) y pollo (2,4%). Sin embargo, en algunos países nórdicos (Suecia, Finlandia y Dinamarca) la mayoría de los casos de enfermedad se asocia a una infección fuera del país de origen (Pires *et al.*, 2011). La omnipresencia de *Salmonella* (Cuadro 2) en el medio natural, junto con los sistemas de producción intensiva que se utilizan en las industrias de la carne, del pescado y del marisco, y el reciclado de despojos y materiales crudos en los piensos animales, han fomentado la importancia continua de este patógeno en la cadena alimentaria global (Doyle *et al.*, 2001).

Se han identificado numerosos reservorios animales y muchos alimentos, particularmente los de origen animal, contaminados con este microorganismo (CE, 2000). Vive en el tracto intestinal de los animales infectados, incluido el hombre, y se excreta a través de las heces, pudiendo permanecer viable en el material fecal durante años fuera del hospedero (ICMSF, 1998).

En Chile, *Salmonella* Enteritidis emergió con características epidémicas en 1994, afectando a gran número de personas, las tasas de ataque aumentaron con respecto a años anteriores (Silva *et al.*, 2000). Durante el periodo epidémico, 1994-1996, 90% de las notificaciones de casos con infecciones por este microorganismo provinieron de África y Antofagasta, gran parte de estas infecciones fueron atribuidas al consumo de huevos (Fica *et al.*, 1997).

Cuadro 2. Principales fuentes de *Salmonella* spp. (Fuentes: Frazier y Westhoff, 1993; Borch *et al.*, 1996; ICMSF, 1998; Davies *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2000; CE, 2000; Doyle *et al.*, 2001; Willeberg, 2000 ; Giovannacci *et al.*, 2001; Swanenburg *et al.*, 2001; Bolton *et al.*, 2002; Hurd *et al.*, 2002; Botteldoorn, 2003; Araújo y Carballo, 2004; Erickson *et al.*, 2004)

Animales	Ganado porcino, vacuno, ovino y caprino: tracto intestinal, nódulos linfáticos, amígdalas, faringe
	Aves: tracto intestinal
	Caballos, gatos, perros, camellos, búfalos, elefantes, canguros, liebres
	visones, conejos, murciélagos, ballenas, delfines, ratas, ratones, cobayos
	Tortugas, culebras, lagartos, cocodrilos
	Ranas, sapos
	Caracoles, cucarachas
	Moscas
	Mariscos
	Alimentos
Instalaciones	Suelo, mesas de trabajo
Equipos	Camal: cuchillos, máquinas de esquinado, flageladora, peladora, agua
Operarios	Operarios: botas, manos, etc.

Desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo, el 60-80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternas, geriátricos y restaurantes.

La fuente más frecuente de infección son los alimentos contaminados en su origen, o con menor frecuencia durante su manipulación por un portador; es también importante la transmisión persona a persona (Caffer *et al.*, 2001). La vía tradicional de infección es la ingestión, siendo también posible la transmisión por aerosoles (Willeberg, 2000).

Aunque los resultados de diversos estudios indican la efectividad de las medidas de control de *salmonella*, este patógeno continúa siendo una de las causas principales de enfermedades gastrointestinales de transmisión alimentaria, además de observarse que no todos los serotipos responden igual que *S. Enteritidis* ante las medidas de control. Es necesaria una continua vigilancia y estudio de los diferentes serotipos de *Salmonella*, así como la búsqueda de nuevas estrategias que permitan un mejor control de estas infecciones.

2.9. RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS

2.9.1.- El problema de la resistencia bacteriana

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y su producción industrial en la década de 1940, revolucionó la medicina de principios del siglo XX, dando lugar a un sentimiento de esperanza para la curación de muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, el panorama al que nos enfrentamos hoy en día, es muy distinto. Los antibióticos son sustancias naturales producidas por microorganismos como un mecanismo de defensa frente a otros, en su afán de competir por la supervivencia. Además, se piensa que podrían actuar como señales de comunicación intercelular entre las bacterias (Yim *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2009).

Estos compuestos, inicialmente descubiertos en bacterias del medio ambiente, han sido modificados por síntesis química para dar lugar a compuestos análogos, denominados agentes antimicrobianos, con notables mejoras en su actividad y reducción en su toxicidad. Todos ellos han sido ampliamente utilizados tanto en medicina humana como en medicina veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos. Además, durante mucho tiempo, se utilizaron los antibióticos como promotores del crecimiento en animales, pollos y cerdos fundamentalmente. Actualmente la legislación europea ha prohibido su uso con este fin; sin embargo en países como Estados Unidos, este uso sigue vigente (Errecalde, 2004; Buckley, 2009; Torres *et al.*, 2010).

El fenómeno de la resistencia bacteriana frente a los antibióticos es un ejemplo de evolución constante, en el cual las bacterias han desarrollado mecanismos para evadir la actividad de estos compuestos (Baquero *et al.*, 2009; Nugent *et al.*, 2010).

Las bacterias pueden adquirir los genes de resistencia a antibióticos por mecanismos de transferencia horizontal (Buckley, 2009; Martínez *et al.*, 2009; Partridge, 2011). La fuerte presión ejercida por el uso masivo de antibióticos tanto en humanos como en animales ha podido ser el factor determinante en el desarrollo de las altas tasas de resistencia que actualmente observamos en un gran número de bacterias, las cuales provocan graves problemas en el tratamiento de infecciones de gran importancia clínica (Theuretzbacher, 2011; Sun *et al.*, 2012).

El problema de la resistencia a los antibióticos es un problema mundial que preocupa a diferentes organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), el Centro para la Vigilancia y el Control de la enfermedades (CDC), la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), etc. Desde estos organismos se llevan a cabo medidas educativas dirigidas al público y a los profesionales de salud para reducir el uso inapropiado de antibióticos, fomentar el desarrollo de nuevos antibióticos, vigilar activamente la evolución de las tasas de resistencia, recoger datos sobre el consumo de antibióticos y fomentar la investigación coordinada de estas resistencias (Baquero y Garau, 2010; Campos *et al.*, 2010).

2.9.2.- Bases bioquímicas de la resistencia

Los antibióticos deben entrar en contacto con la bacteria para poder ejercer su acción tóxica. Para poder comprender los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias es inevitable revisar en primer lugar su mecanismo de acción (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Van Hoek *et al.*, 2011).

- *Mecanismos de acción*

Hoy en día existen numerosas familias de antibióticos que pueden clasificarse según su mecanismo de acción sobre la bacteria. Estos mecanismos pueden afectar la síntesis de la pared celular, afectando así al transporte de sus precursores o la organización estructural de la pared; pueden afectar la membrana citoplasmática; el bloqueo de vías metabólicas esencial de la bacteria, sobre todo las que se encargan de la obtención de aminoácidos o las bases puricas y pirimidínicas de los nucleótidos; pueden afectar directamente al ADN, tanto en su metabolismo como en su estructura, en los procesos de replicación y transcripción y por último pueden afectar la síntesis proteicas en sus diferentes fases de activación, fijación del RNAt o la fase de elongación (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; van Hoek *et al.*, 2011).

- ***Mecanismos de resistencia***

Frente a estos mecanismos de acción, las bacterias han desarrollado sus propios mecanismos de defensa basados en la presencia de enzimas específicas que modifican o inactivan al antibiótico, en la superproducción de la diana de acción del antibiótico, en la modificación de la diana celular o síntesis de una diana alternativa, en la expulsión del antibiótico al exterior celular mediante bombas de expulsión activa y en la alteración de la permeabilidad de membrana por pérdida de funcionalidad de porinas, lo que restringe el acceso del antibiótico a la diana bacteriana (Michael *et al.*, 2006; Van Hoek *et al.*, 2011).

Estos mecanismos de resistencia pueden alcanzar bien por mutaciones cromosómicas en el DNA bacteriano, que alteran proteínas ya existentes y funcionales; o bien como resultado de una transferencia o adquisición de nuevo material genético entre las bacterias de la misma especie o distintas. Además, estos mecanismos no tienen por qué darse de forma aislada, sino que dos o más pueden interactuar para determinar el nivel final de resistencia a antibióticos de un microorganismo (Michael *et al.*, 2006).

2.9.3.- β -lactámicos

2.9.3.1. Estructura química y clasificación:

El primer representante de este grupo fue la penicilina, descubierta en 1928 por Alexander Fleming, constituyen uno de los grupos de antibióticos más prescritos. La presencia del anillo β -lactámico define químicamente a esta familia de compuestos, que se caracterizan por presentar baja toxicidad (actúan sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula animal) y su principal mecanismo de resistencia son la acción de las β -lactamasas. Dentro de la familia de los β -lactámicos existen distintos grupo, dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química modifican las características de éste, tales como el espectro, afinidad o resistencia a las β -lactamasas (Marín y Gudiol, 2003; Suárez y Gudiol, 2009).

2.9.3.2. Mecanismos de acción:

Bloquean la fase final de la síntesis del peptidoglucano al inhibir, en mayor o menor grado, las enzimas que participan en la formación de esta estructura, las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP). Las PBP con actividad transpeptidasa son la diana preferente de este grupo, interfieren en la transpeptidación, durante la última etapa de síntesis de la pared celular, de modo que la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que el antibiótico pueda actuar es necesario que la bacteria se halle en fase de crecimiento celular, ya que es cuando se sintetiza la pared celular (Suárez y Gudiol, 2009; Kong *et al.*, 2010).

También actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las cepas que carecen de esta son denominadas cepas tolerantes a los β -lactámicos, puesto que inhiben su crecimiento en presencia del antibiótico pero no se destruyen completamente (Suárez y Gudiol, 2009; Kong *et al.*, 2010).

2.9.3.3. Resistencia:

El principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos, es la producción de β -lactamasas, estas son enzimas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos β -lactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana, estas enzimas han sido clasificadas utilizando dos aproximaciones:

En función de su estructura proteica, donde dividen a las β -lactamasas en las clases A, B, C, y D (Ambler, 1980).

En función de sus características bioquímicas y funcionales, propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 y actualizada en 2010 (Bush *et al.*, 1995; Bush y Jacoby, 2010). Esta clasificación establece distintos grupos, en función del sustrato y perfil de inhibición por inhibidores de β -lactamasas (Cuadro 3).

B-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Un grupo importante de enzimas son las B-lactamasas de espectro extendido (BLEE) que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefexitina), ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico (Livermore, 2008).

Cuadro 3. Esquema de clasificación de B-lactamasas (Drawz y Bonomo, 2010).

Clasificación Molecular (Ambler, 1980)	Clasificación Funcional (Bush y Jacoby (2010)	Sustratos preferidos	Inhibición por		Beta-lactamasas representativas
			CLV o TZ	EDTA	
A (Serin Penicilinasas)	2a	Penicilinas	+	-	PC1 (<i>S.aureus</i>) TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2b (penicilinasas)	Penicilinas, C1G	+	-	
	2be (B-lactamasas De amplio espectro)	Penicilinas, C1G, C4G Monobactámicos	+	-	SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26 CTX-Ms
	2br	Penicilinas	-	-	TEM-30, SHV-10, SHV-72
	2c	Penicilinas Carbencilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4 CARB-3
	2e 2f (serin-Carbapenemasas)	C1G-C4G Carbapenémico	+	-	CepA, FEC-1 KPC-2, IMI-1, SME-1
B (metalo-betalact.)	3a (metalo-B-Lactamasa)	Carbapenémicos	-	+	IMP-1, VIM-1, Cer-A, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
	3b (metalo-B-Lactamasa)	Carbapenémicos	-	+	CphA, Sfh-1
C (Cefalosporinas)	1	Cefalosporinas	-	-	<i>E.col</i> AmpC, P99, ACT-1 CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Cefalosporinas	-	-	GGC1, CMY-37
D (oxacilinasas)	2d (cloxacilinas)	Cloxacilina	variable	-	OXA-1 a OXA-10
	2de	C1G- C4G	variable	-	OXA-11 a OXA-15
	2df (carbapenemasa)	Carbapenémicos	variable	-	OXA-23, OXA-48

Estas β -lactamasas pertenecen a la clase moléculas A de Ambler y entre ellas se encuentran las de tipo TEM y SHV (derivadas de enzimas con menor espectro de hidrólisis), la familia CTX-M (procedentes de β -lactamas cromosómicas del género *Kluyvera*), y otras menos prevalentes como PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, incluidas todas ellas en el grupo funcional 2be de Bush y Jacoby (Bradford PA, 2001 y Ángel-Días *et al.*, 2009)

La primera β -lactamasa mediada por plásmidos fue descrita en 1965 la cual se denominó TEM-1 y se diseminó rápidamente a otros miembros de las Enterobacteriáceas. Poco tiempo después fue encontrada la β -lactamasa SHV-1 (sulfihidrilo-variable). La aparición e introducción de los antibióticos β -lactámicos de espectro extendido (ceftazidima, cefotaxima, aztreonam) en los años 80s conllevó a la emergencia de una nueva clase de enzimas β -lactamasas, las de espectro extendido (Knothe *et al.*, 1983).

Otras enzimas BLEE también pertenecientes a la clase A, aunque de subgrupo 2ber son las β -lactamasas CMT (complex mutant TEM) como la TEM-50 que combinan una cierta resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico junto a una mayor actividad frente a oximino-cefalosporinas (Cantón *et al.*, 2008). Algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler y grupo funcional 2de), se consideran también β -lactamasas de espectro extendido y se han descrito con mayor frecuencia en *P. aureginosa* (Ferrán *et al.*, 2011).

B-lactamasas tipo AmpC.

Las AmpC constituyen otro tipo de β -lactamasas que, a diferencia de las BLEE, no poseen en la actualidad un método estandarizado por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI), para su detección fenotípica.

Este hecho, aunado a la dificultad para dilucidar fenotípicamente si se esta en presencia de una AmpC cromosómica o plasmídica, y a la carencia de inhibidores de AmpC para su uso *in vivo* hacen considerar a estas enzimas como un emergente problema terapéutico (Mirelis *et al.*, 2006)

Este espectro de hidrólisis puede ampliarse y afectar además a cefalosporinas de cuarta generación (AmpC de espectro extendido), pero se desconoce cuál es la prevalencia y la relevancia clínica y epidemiológica de estas variantes de AmpC. La cloxacilina, así como el ácido borónico y sus derivados (ácido fenil-borónico), inhiben a las β -lactamasas de tipo AmpC, mientras que el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam no son buenos inhibidores (Ferran *et al*, 2011). La producción de AmpC puede ser constitutiva o inducible, siendo los niveles de producción dependientes del grado de expresión del gen bla-AmpC (Jacoby, 2009).

Todos los β -lactámicos son inductores de estas enzimas en mayor o menor grado, las cepas salvajes productoras de AmpC, lo hacen a bajos niveles (o niveles basales), gracias al sistema represor, confiriendo un fenotipo de resistencia natural característico de la especie bacteriana, o puede hacerlo a unos niveles muy superiores al basal (sobreexpresión del gen ampC mediada por mutaciones en el atenuador (gen ampD) y/o promotor (gen ampR). Lo cual resulta en la hiperproducción de ampC, un término que se ha denominado desrepresión. En determinadas especies bacterianas como *E. cloacae*, *M. morgani*, *P. aeruginosa* etc. el gen bla-AmpC se expresa de forma inducible. En los aislados que tienen un gen bla-AmpC inducible, su expresión puede estar desreprimida establemente de forma parcial o total. Los mutantes parcialmente desreprimidos expresan un incremento moderado de los niveles de AmpC; mientras que los mutantes totalmente desreprimidos, expresan altos niveles; por lo tanto, cepas con AmpC natural cromosómica inducible pierden el fenotipo de inducción y pasan a producirla constitutivamente (Jacoby, 2009; Navarro F, 2010; Bush y Jacoby, 2010; y Mata *et al.*, 2010).

Las β -lactamasas de clase molecular C de Ambler, grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush y Jacoby, 2010), independientemente del mecanismo que conduce a una hiperproducción de AmpC, los aislados hiperproductores de AmpC presentan un fenotipo de resistencia (fenotipo AmpC) a las penicilinas, las asociaciones de β -lactámicos con inhibidores de β lactamasa, cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas generalmente las cefamicinas (cefoxitina), así como las de tercera generación, pero en grado variable, dependiendo del nivel de hiperproducción. Los aislados con fenotipo AmpC suelen ser además sensibles a las cefalosporinas de cuarta generación y a los carbapenémicos, aunque dicha sensibilidad se reduce

significativamente si se produce la pérdida de alguna porina relacionada con la resistencia antimicrobiana (Jacoby, 2009 y Navarro, 2010).

Las β lactamasas AmpC plasmídicas, que pueden estar presentes en *klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, o *Proteus spp.*, están altamente relacionadas con aquellas AmpC cromosómicas de *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* o *Aeromonas spp.*, pero son fácilmente transferibles y suelen producir muy alto nivel de resistencia (Jacoby, 2009; Busch y Jacoby, 2010). Pueden ocasionar fracasos terapéuticos, similares a los descritos en infecciones causadas por aislados hiperproductores de AmpC cromosómica inducible (selección de mutantes con desrepresión estable) en tratamientos con β -lactámicos (Ferran, 2011).

2.9.4.- Quinolonas

2.9.4.1. Estructura química y clasificación:

Las quinolonas son grupo de antibióticos sintéticos caracterizados por una estructura bicíclica hetero-aromática, constituida por un núcleo piridona β -ácido carboxilo y un anillo aromático. El ácido nalidíxico, primera quinolona sintetizada en el año 1962 (Lesher *et al.*, 1962).

Pese a su potente actividad, su uso clínico está limitado a infecciones del tracto urinario y finalmente fue relegada a un segundo plano con la síntesis de la fluoroquinolonas, derivados 6-fluoro y 7-piperazinil, que aumentan la potencia y el espectro de acción (Mella *et al.*, 2000; Alós, 2003;; Poirel *et al.*, 2012). Destacan las fluoroquinolonas que en la posición 7 poseen un grupo piperacínico (norfloxacin, ciprofloxacilina) o un grupo metil-piperacínico (ofloxacin, levofloxacin) (Mella *et al.*, 2000).

2.9.4.2. Mecanismo de acción:

Su mecanismo de acción es bastante complejo. De manera sencilla, podríamos decir que las quinolonas inhiben la síntesis del DNA. Una vez que han penetrado en el interior de la bacteria, éstas interaccionan con el complejo formado entre el DNA cromosómico bacteriano y la topoisomerasa II que está actuando en el proceso de replicación. Las topoisomerasas implicadas en este proceso son la topoisomerasa II A o la topoisomerasa IV que controlan la topología del DNA cromosómico, facilitando la replicación, recombinación y expresión del mismo (Hawkey, 2003).

La DNA-girasa es una topoisomerasa II que posee la función de separar las hebras de ADN tras cada replicación, aunque también se detecta que posee una actividad relajante sobre la cadena de DNA. Esta enzima es la diana primaria de las quinolonas en bacterias Gram-negativas (Hawkey, 2003).

El mecanismo de acción de las quinolonas sobre esta enzima tiene un paso importante, que es la formación de un complejo quinolona-enzima-DNA. Este proceso ocurre cuando la enzima ya ha producido extremos libres en el DNA, con lo que la unión de la quinolona estabiliza un complejo que supone una barrera física para el movimiento de la horquilla de replicación, la RNA-polimerasa y la DNA-helicasa. Por tanto se bloquea la síntesis de DNA y el crecimiento celular, responsable de la acción bacteriostática de las quinolonas (Alós, 2003; Hawkey, 2003; Rodríguez-Martínez, 2005).

2.9.4.3 Resistencia:

Las quinolonas y fluoroquinolonas son antibióticos usados para el tratamiento de salmonelosis invasiva y sistémica. Aunque probablemente el uso en el ámbito clínico ha contribuido a la emergencia de cepas resistentes a quinolonas (Plecchi *et al.*, 2012).

La resistencia a fluoroquinolonas que podemos observar es el punto final de una acumulación de varios mecanismos bioquímicos cooperativos que resultan de la acumulación de varios eventos genéticos (Hawkey, 2003; Giraud *et al.*, 2006). Los diversos mecanismos de resistencia se pueden manifestar de forma aislada o en combinación e incluyen:

Mutaciones cromosomales, es el principal mecanismo de adquisición de resistencia a fluoroquinolonas en *Salmonella spp.* Entre estas se encuentran las QRDRs (quinolone resistance-determining regions) de los genes blancos (*gyrA* y *gyrB*, que codifican las subunidad A y B de la DNA girasa, respectivamente y, *parC* y *parE* que codifican la subunidad A y B de la topoisomerasa IV, respectivamente) (Cavaco *et al.*, 2009). Estas mutaciones dan lugar a topoisomerasas con menor afinidad a las quinolonas que se traducen en aumento de los valores de CIM de las fluoroquinolonas. El nivel de resistencia es variable, dependiendo de la diana afectada y del número de mutaciones acumuladas.

Sobreexpresión de bombas de eflujo o las alteraciones de las porinas, conducen a alteraciones en la permeabilidad de la membrana, lo que disminuye la penetración intracelular del antibiótico y la actividad de transportadores activos endógenos que provocan la expulsión de los antimicrobianos desde la membrana celular al medio exterior (Fábrega *et al.*, 2009).

Resistencia plasmídica, esta resistencia es debida a genes *qnr* (QnrA, B and S), los cuales han sido identificados en diferentes especies de enterobacterias incluyendo *Salmonella spp.* (Nordmann y Poirel 2005; Gay *et al.*, 2006).

Estos genes codifican proteínas Qnr que son pentapéptidos repetidos que pueden bloquear la unión de las fluoroquinolonas a la ADN girasa y topoisomerasa IV de las bacterias. El nivel de resistencia que causa Qnr es moderado y no produce por si solo plena resistencia, según los puntos de corte del CLSI para enterobacterias (>4 mg/L para ciprofloxacina), por lo que se observa sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas (Nordmann y Poirel 2005).

La inactivación enzimática, de ciertas quinolonas es un mecanismo recientemente descrito. La variante *cr* de *aac* (6'')-Ib codifica una enzima aminoglicósido acetiltransferasa, que confiere sensibilidad reducida a ciprofloxacina por una N-acetilación de su amino piperazilino (Robicsek *et al.*, 2006). Esta acetiltransferasa aumenta en 3-4 veces las CIM de algunas fluoroquinolonas, como ciprofloxacina y norfloxacina pero no afecta la actividad de las quinolonas o fluoroquinolonas que no poseen el sustituyente, como ac. Nalidixico y levofloxacina respectivamente.

2.9.5.- Mecanismos de resistencia a otros antibióticos

2.9.5.1. Resistencia a aminoglucósidos

Este grupo de antibióticos fue descubierto a principio de los años cuarenta a partir del microorganismo *Streptomyces griseus*, que da nombre a uno de los antibióticos más conocidos: la estreptomicina. Posteriormente, se lograron caracterizar más compuestos de este tipo como la neomicina, kanamicina o gentamicina. Su mecanismo de acción es bactericida y pasa por la inhibición de la síntesis proteica (por su fijación a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano), lo que afecta directamente a la integridad de la membrana celular bacteriana, creando porosidades en ésta (Ramírez y Tolmasky, 2010; Van Hoek *et al.*, 2011).

Aunque los mecanismos de resistencia adquiridos en esta familia son variados, el mecanismo más común tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas son las enzimas capaces de modificar los grupos amino o hidroxilo de la molécula de antibiótico, bloqueando de esta manera su actividad antibacteriana. Otros mecanismos de resistencia a aminoglucósidos están ocasionados por la disminución de la concentración celular mediada por bombas de expulsión activa, la disminución de la permeabilidad de la membrana, alteraciones ribosomales (mediante mutaciones en las proteínas ribosomales o en la subunidad 16S de RNAr) o la metilación del sitio de unión del antibiótico al ribosoma mediado por enzimas metilasas (Van Hoek *et al.*, 2011).

2.9.5.2. Resistencia a fenicoles/cloranfenicoles

El cloranfenicol fue obtenido por primera vez a partir de la bacteria del suelo *Streptomyces venezuelae* y aunque posteriormente se ha logrado obtener de otras especies de *Streptomyces*, actualmente se produce por síntesis. Estos antibióticos poseen una alta especificidad y actúan como potentes inhibidores de la síntesis proteica debido a su afinidad y bloqueo de la peptidiltransferasa de la subunidad 50S ribosomal, interfiriendo de esta forma en la elongación de las cadenas peptídicas. Los fenicoles son derivados fluorados que mantienen el amplio espectro de acción tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, aerobias como anaerobias; sin embargo, la alta toxicidad de fenicoles/cloranfenicoles limita su uso (Shaw, 1984; Van Hoek *et al.*, 2011).

Entre los mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos encontramos la inactivación enzimática y la expulsión activa mediante bombas de eflujo. La inactivación enzimática se da gracias a las enzimas denominadas “Cloranfenicol Acetil Transferasas, CAT”. Se ha encontrado dos tipos diferentes de proteínas CatA (genes *catA1*, *cat A2*) y distintos tipos de proteínas CatB (*catB2*, *catB3* y *catB8*) en *Salmonella*. Por otra parte, también existen proteínas que actúan como transportadores que median en la expulsión de cloranfenicol y florfenicol de la célula, como son las proteínas Cml y Flo. En *Salmonella* encontramos los genes *cmlA*, responsables de codificar la proteína mediadora de expulsión del cloranfenicol, y *florR*, gen responsable de mediar la expulsión de cloranfenicol y florfenicol (Michael *et al.*, 2006; Van Hoek *et al.*, 2011).

2.9.5.3. Resistencia a tetraciclina

Las tetraciclinas fueron descubiertas en distintas especies de *Streptomyces*, comenzando por *Streptomyces aureofacines* aunque actualmente disponemos de productos semi-sintéticos como doxiciclina, minociclina o tigeciclina (Chopra, 1994; Chopra y Roberts, 2001; Vicente y Perez-Trallero, 2010). Las tetraciclinas fueron los primeros compuestos donde se pudo aplicar el término “amplio espectro”. Debido a esto, a su relativa baja toxicidad y su bajo costo, las tetraciclinas han sido utilizadas en todo el mundo y han destacado en segunda posición de ranking mundial de consumo de antibióticos, después de las penicilinas (Chopra y Roberts, 2001; Van Hoek *et al.*, 2011).

Aunque inicialmente se pensó que las tetraciclinas y sus derivados actuaban solo inhibiendo el crecimiento bacteriano mediante su interacción con el ribosoma y bloqueo de la síntesis proteica (tetraciclinas denominadas “típicas”, como clortetraciclina, doxiciclina, minociclina y tetraciclina); se ha sugerido un modo de acción adicional. Algunos derivados de tetraciclina, denominadas “atípicas” (anhidrotetraciclina y 6-thiotetraciclina) se muestran como inhibidores pobres de síntesis proteica por su baja afinidad al ribosoma. En su lugar, estas tetraciclinas actúan interaccionando con la membrana bacteriana (Chopra, 1994; Roberts, 2002; Van Hoek *et al.*, 2011).

El principal mecanismo de resistencia a tetraciclinas son las bombas de expulsión activa del antibiótico al exterior de la bacteria. Se han descrito más de 40 genes diferentes relacionados con la resistencia a este tipo de antibióticos, aunque tan solo cinco de ellos han sido encontrados en *Salmonella*: tet (A), tet (B), tet (C), tet (D), tet (G). Estas bombas de expulsión asociadas a membrana están formadas por 12 segmentos proteicos transmembrana cuya función es la de exportar tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina (Michael *et al.*, 2006). Cada uno de estos genes está bajo la regulación de un gen represor, gen *tetR*, cuya orientación es opuesta al gen que regula y su función represora es necesaria en condiciones de ausencia de antibióticos para evitar el daño celular que puede provocar la sobreexpresión de una bomba de eflujo continua (Berens y Hillen, 2003).

2.9.5.4. Resistencia a sulfamidas y trimetoprim

Las sulfamidas, que comenzaron a utilizarse a principios de los años treinta, representan los antibióticos sintéticos más antiguos (Skold, 2001). Apartir de los años sesenta comenzó a utilizarse la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol (cotrimazol) debido a que en combinación, mostraban mayor efecto bactericida (Bean *et al.*, 2009; Van Hoek *et al.*, 2011).

Las sulfamidas son estructuralmente análogas al ácido p-aminobenzoico (PABA), involucrado en la ruta sintética de ácido fólico, precursor indispensable en la síntesis de bases nitrogenadas y aminoácidos. Por tanto, las sulfonamidas compiten con el ácido paraaminobenzoico por la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS), llegando a su inhibición (Michael *et al.*, 2006; Van Hoek *et al.*, 2011).

A pesar de su naturaleza sintética, la resistencia a sulfamida entre las bacterias patógenas se detectó casi de inmediato a su introducción en la práctica clínica. La resistencia de bajo nivel se debe a mutaciones localizadas en el gen folP, gen codificante de la enzima DHPS (Skold, 2001; Van Hoek *et al.*, 2011).

En cuanto a la resistencia adquirida a sulfamidas, en *Salmonella* se conocen tres tipos de genes de resistencia a sulfamidas: sul1, sul2 y sul3, que codifican la forma resistente de la enzima DHPS (Michael *et al.*, 2006). El gen sul1 forma parte del segmento 3'' conservado de los integrones de clase 1, por lo que se encuentra ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas; mientras que el gen sul2 se encuentra muy relacionado con los genes strA y strB de resistencia a aminoglucósidos (Bean *et al.*, 2009). Se ha identificado el gen sul3 en cepas de *E. coli* (Perreten y Boerlin, 2003), que ya ha sido detectado en algunos serotipos de *Salmonella* como Agona, Brandeburg y Typhimurium (Guerra *et al.*, 2004).

El trimetoprim comenzó a comercializarse en los años sesenta y, al igual para las sulfamidas, se trata de un antibiótico sintético. Su mecanismo de acción se basa en inhibir la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que actúa en la última etapa del metabolismo del ácido tetrahidrofólico (Michael *et al.*, 2006; Van Hoek *et al.*, 2011). Se han observado niveles basales de resistencia a trimetoprim debido a variantes cromosómicas del gen folA, codificante de la enzima DHFR (Skold, 2001; Van Hoek *et al.*, 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Estudio transversal descriptivo. En el presente estudio se caracterizó retrospectivamente y de manera profunda el nivel de resistencia antimicrobiana, enfocándonos en la presencia de fenotipos de resistencia de los aislamientos de *Salmonella* provenientes de las muestras animales procesadas por el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante el año 2015.

3.2 Descripción y tamaño de muestra

Se utilizaron 50 aislados de *Salmonella enterica* provenientes de diversas especies animales y procesadas en el laboratorio. Sólo fueron utilizados los aislados identificados según normal ISO: 6579(2002) como criterio de inclusión (cuadro 4). En tal sentido, no fue necesario realizar un cálculo de tamaño de muestra, debido a que el enfoque del estudio fue caracterizar la resistencia antimicrobiana de todos los aislamientos de *Salmonella* que cumplan con el criterio de inclusión indicado.

Cuadro 4. Identificación de las muestras.

CODIGO	ESPECIE	CODIGO	ESPECIE	CODIGO	ESPECIE
E9	CUY	E36	COBAYO	48L	PORCINO
E10	COBAYO	E37	COBAYO	53C	PORCINO
E11	COBAYO	E38	COBAYO	61V	PORCINO
E12	PORCINO	E39	COBAYO	79C	PORCINO
E13	COBAYO	E40	COBAYO	71V	PORCINO
E14	COBAYO	E42	AVE (PATO)	77L	PORCINO
E17	COBAYO	E43	COBAYO	77P	PORCINO
E18	COBAYO	E44	AVE	111C	PORCINO
E20	COBAYO	E45	PORCINO	117V	PORCINO
E24	COBAYO	E46	AVE (CODORNIZ)	122V	PORCINO
E26	BOVINO	E47	AVE	150C	PORCINO
E27	COBAYO	E50	PORCINO	162L	PORCINO
E28	COBAYO	E51	COBAYO	166P	PORCINO
E29	COBAYO	E52	COBAYO	168V	PORCINO
E30	AVE (PATO)	3C	PORCINO	172V	PORCINO
E31	AVE (PATO)	7C	PORCINO	172C	PORCINO
		42L	PORCINO	232L	PORCINO

3.3. Materiales, Equipos, Reactivos y Medios de Cultivo

- Asa bacteriológica
- Portaobjetos
- Guantes de látex
- Mechero
- Hisopos estériles
- Placas Petri 100 x 15 mm estériles
- Puntas de micropipeta estériles (100-1000 μ l)
- Tubos de vidrio estériles
- Gradillas
- Baño maría a 50°C
- Estufa para incubación a 37°C
- Estufa para incubación a 42°C
- Micropipeta (100 - 1000 μ l)
- Tips para pipetas automáticas
- Agar Tripticasa de Soya (TSA)
- Solución salina 0.85%
- Agar Mueller – Hinton (MH)
- Discos Antibióticos (Marca OXOID): Ampicilina (10 μ m), Amoxicilina con ác. Clavulónico (20 μ m + 10 μ m), Cefalotina (30 μ m), Ceftazidima (30 μ m), Cefotaxima (30 μ m), Cefepime (30 μ m), Aztreonam (30 μ m), Cefoxitina (30 μ m), Ceftriaxona (30 μ m), Gentamicina (10 μ m), Tobramicina (10 μ m), Neomicina (30 μ m), Amikacina (30 μ m), Estreptomina (10 μ m), Ácido Nalidíxico (30 μ m), Ciprofloxacino (5 μ m), Oxitetraciclina (30 μ m), Cloranfenicol (30 μ m), Trimetoprim/Sulfametoxazol (1.25 μ m+ 23.75 μ m), Cloxacilina (200 μ g).

3.4. Procesamiento de las Muestras

3.4.1. Reactivación de los aislados

Todos los aislados de *Salmonella* fueron criopreservados con anterioridad en el laboratorio en viales de 1.5ml utilizando caldo de cultivo Tripticasa de Soya (TSB) y Glicerol al 87%, en una proporción 50/50. Para el estudio, cada aislado fue sembrado por triplicado en agar nutritivo Tripticasa de Soya para su reactivación (Sánchez y Corrales., 2005).

3.4.2. Estudios de sensibilidad

- Difusión en agar: Método Kirby Bauer

Se detectó la resistencia de los aislados a 20 antibióticos representativos de las distintas familias, mediante el uso de la técnica de Kirby Bauer siguiendo las recomendaciones del CLSI (2012). Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina (0.85%) con una turbidez de 0.5 McFarland a partir de un cultivo fresco. Se inoculó de manera homogénea con un hisopo estéril sobre la superficie de una placa de Agar Mueller Hinton, y se colocaron los discos de antibióticos. Las placas se incubaron a 37°C. Se leyeron los halos de inhibición producidos a las 18-24 horas. La interpretación se realizó siguiendo los puntos de corte propuestos por el CLSI (Cuadro 5), los resultados fueron expresados como sensible, intermedio o resistente.

Cuadro 5. Antibióticos utilizados en la prueba de Kirby Bauer y puntos de corte considerados (CLSI, 2012)

ANTIBIÓTICO	Concentración (ug/disco)	Halo de inhibición (mm)		
		R	I	S
Ácido Nalidíxico (AN)	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Amikacina (MK)	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)	20 + 10	≤ 13	14-17	≥ 18
Ampicilina (AM)	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Aztreonam (AZ)	30	≤ 17	18-20	≥ 21
Cefalotina (CF)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefepime (FEP)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima (CTX)	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Cefoxitina (FOX)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Ceftazidima (CAZ)	30	≤ 17	18-20	≥ 21
Ceftriaxona (CRO)	30	≤ 13	14-20	≥ 21
Ciprofloxacina (CIP)	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Cloranfenicol (C)	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Cloxacilina (CX)	1	≤ 10	11–12	≥ 13
Estreptomina (S)	10	≤ 11	12–14	≥ 15
Gentamicina (GE)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Neomicina (N)	30	≤ 12	13-16	≥ 17
Oxitetraciclina (OXT)	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Sulfatrimetoprim (SXT)	1,25 + 23,75	≤ 10	11–15	≥ 16
Tobramicina (NN)	10	≤ 12	13-14	≥ 15

- **Detección del fenotipo de resistencia ACSSuT (resistencia a tetraciclinas, β -láctamicos, aminoglucósidos, sulfonamidas y fenicoles).**

Se evaluó el fenotipo de resistencia ACSSuT, se consideró a un aislado a este fenotipo si presentó resistencia a cloranfenicol, ampicilina, estreptomicina, sulfamidas, y tetraciclina.

- **Detección fenotípica de β lactamasas de espectro extendido (BLEE)**

Se evaluó la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante la técnica de doble disco según EUCAST (De Toro *et al.*, 2011). El protocolo consistió en situar un disco con cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina- ácido clavulánico. Se examinó visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretaron de la siguiente manera:

- Positivo. Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam en la zona próxima al disco con amoxicilina- ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor.

- Negativo. No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam ni presencia de "zona fantasma".

- **Detección fenotípica de β lactamasas tipo AmpC**

No existen métodos fenotípicos estandarizados por el CLSI o EUCAST para su detección, sin embargo, se han diseñado diversos procedimientos. En el estudio se desarrollaron dos protocolos en paralelo para la detección de estas enzimas:

1. Método de aproximación de discos:

Propuesto por Sanders y Sanders (1979), aplicable para β lactamasas AmpC inducibles, no es de utilidad en cepas desreprimidas, hiperproductoras o con β lactamasas AmpC plasmídica constitutiva. La técnica consistió en realizar un antibiograma convencional y colocar un disco de Cefoxitina (antibiótico inductor) a una distancia de 27 mm centro-centro de un disco de Ceftazidima y Ceftriaxona (antibiótico sustrato, revelador o testigo). Los resultados se interpretaron de la siguiente manera:

- Positivo. Achatamiento del halo de inhibición (forma de D) de los β lactámicos inductores débiles (Ceftazidima, Ceftriaxona) en la zona a próxima al disco con el β -lactámico inductor fuerte (Cefoxitina).

- Negativo. No modificación de los halos de inhibición.

2. Detección de AmpC usando inhibidores específicos:

Se situó un disco con cefotaxima y un disco con ceftazidima a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con cloxacilina o ácido borónico (Mirelis *et al.*, 2006). Los resultados se interpretaron de la siguiente manera:

- Positivo. Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima o ceftazidima en la zona próxima al disco con cloxacilina o ácido borónico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas y el inhibidor.

- Negativo. No ampliación de los halos de inhibición de las cefalosporinas ni presencia de "zona fantasma"

3.5 Análisis de datos

Se evaluarán los fenotipos de resistencia ACSSuT, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y betalactamasas tipo Amp C encontrados entre los aislados de *Salmonella*, presentando los resultados en tabla de frecuencia y porcentaje.

IV RESULTADOS

Se realizó un estudio para determinar fenotipos de resistencia en 50 aislados de *Salmonella enterica* provenientes de infecciones de diversas especies de animales domésticos, identificados según norma ISO: 6579 (2002) provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante el año 2015.

Según el protocolo utilizado para detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), el 2% (1/50), presentó un fenotipo de resistencia compatible, correspondiente a una cepa de Ave (Cuadro 7 y 8, figura 1).

Para la detección de β -lactamasas AmpC, fueron utilizadas dos metodologías basadas en la aproximación de discos y el uso de inhibidores. Se detectó un 2% (1/50) de aislados compatibles con este tipo de β -lactamasas, según el protocolo que incluyó el uso de inhibidores, presente en una cepa de Cobayo (Cuadro 7 y 8, figura 2).

En el estudio se determinó la presencia del fenotipo de pentarresistencia ACSSuT, el cual, se caracteriza por presentar resistencia a Ampicilina, Cloranfenicol, Oxitetraciclina, Sulfatrimetoprim y Estreptomina. Se determinó la presencia del fenotipo en un 2% del total de aislados (1/50), correspondiente a una cepa de origen Porcino (Cuadro 7 y 8, figura 3).

El 80% de los aislados estudiados presentaron fenotipo de multiresistencia, resistencia a tres o más familias de antibióticos, a los que habitualmente son sensibles, incluyendo β lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), aminoglucósidos y quinolonas, los fenotipos de multiresistencia más comúnmente encontrados fueron los que se relacionaron a antibióticos anteriormente mencionados: Cloranfenicol-Oxitetraciclina-Tobramicina (30%), Cloranfenicol-Ácido Nalidíxico-Tobramicina-Neomicina (25%), Cloranfenicol-Ácido nalidixico-Oxitetraciclina-Neomicina-Tobramicina (15%).

Al realizar la prueba de Kirby Bauer, del total de cepas incluidas en el estudio, el 96% (48/50) fueron resistentes a por lo menos un antibiótico; las frecuencias más altas de resistencia se presentaron al cloranfenicol 94%(47/50), seguido por tobramicina 72%(36/50), oxitetraciclina 62%(31/50), cloxacilina 42% (21/50), neomicina 40%(20/50), ácido nalidixico 38%(19/50), estreptomina 28%(14/50), ampicilina 26%(13/26) y amoxicilina-ácido clavulánico 22%(11/22),(Cuadro 6).

Por otro lado, se observó porcentajes de resistencia bajos en aztreonam (10%), cefalosporinas (2%-12%), sulfatrimetoprim (8%) y gentamicina (4%), una resistencia intermedia a ciprofloxacino (4%) y una sensibilidad del 100% para Amikacina.

Cuadro 6. Frecuencia absoluta y relativa de la susceptibilidad de *Salmonella* a los antibióticos. N°: Número absoluto; Dato numérico igual a cero no resultante de redondeo.

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE		INTERMEDIO		RESISTENTE	
	N	%	N	%	N	%
Ácido Nalidíxico (AN)	25	50	6	12	19	38
Amikacina (MK)	50	100	0	0	0	0
Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)	39	78	0	0	11	22
Ampicilina (AM)	32	64	5	10	13	26
Aztreonam (AZ)	44	88	1	2	5	10
Cefalotina (CF)	44	88	0	0	6	12
Cefepime (FEP)	44	88	3	6	3	6
Cefotaxima (CTX)	48	96	1	2	1	2
Cefoxitina (FOX)	42	84	2	4	6	12
Ceftazidima (CAZ)	42	84	3	6	5	10
Ceftriaxona (CRO)	48	96	0	0	2	4
Ciprofloxacina (CIP)	48	96	2	4	0	0
Cloranfenicol (C)	1	2	2	4	47	94
Cloxacilina (CX)	25	50	4	8	21	42
Estreptomina (S)	28	56	8	16	14	28
Gentamicina (G)	44	88	4	8	2	4
Neomicina (N)	25	50	5	10	20	40
Oxitetraciclina (OXT)	7	14	12	24	31	62
Sulfatrimetoprim (SXT)	42	84	4	8	4	8
Tobramicina (NN)	6	12	8	16	36	72

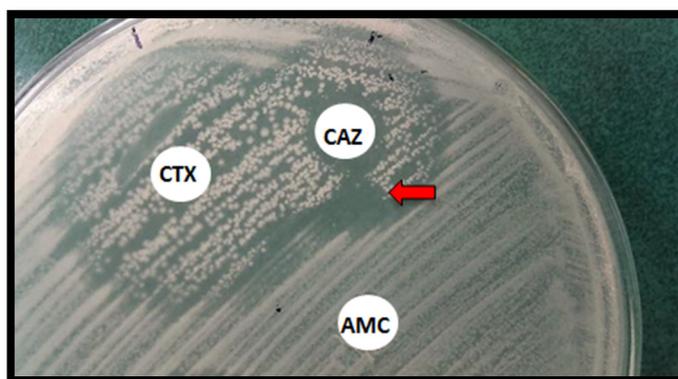


Figura 1. Presencia de fenotipo BLEE. Deformación (sinergia) del halo de inhibición de cefalosporina (ceftazidima), en presencia de ácido clavulánico. (AMC: Amoxicilina-ácido clavulánico, CTX: cefotaxima, CAZ: Ceftazidima).

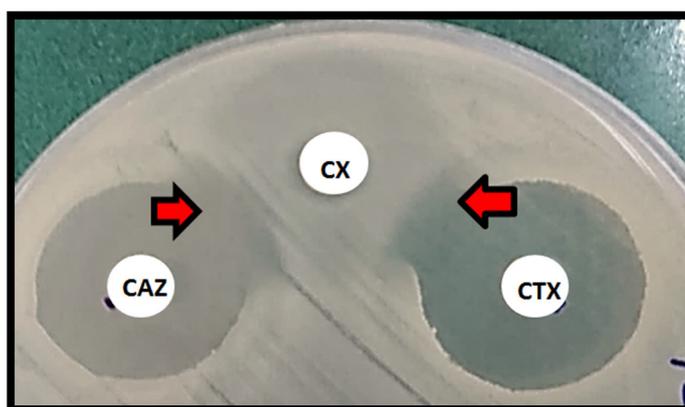


Figura 2. Presencia del fenotipo AmpC. Ampliación del halo de inhibición en la zona próxima a la Cloxacilina. (CX: cloxacilina, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima).

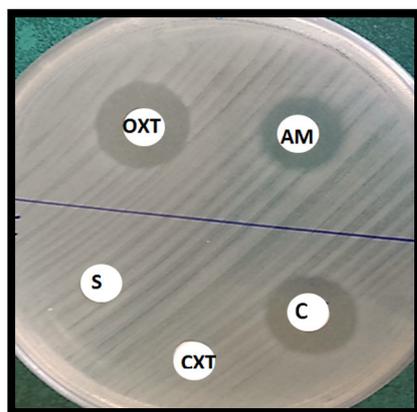


Figura 3. Presencia del fenotipo ACCSuT (Pentaresistencia), (OXT: oxitetraciclina, AM: ampicilina, S: estreptomicina, CTX: cefotaxima, C: cloranfenicol).

Cuadro 7. Frecuencia de fenotipos de resistencia

Fenotipo de Resistencia	Aislados	
	N	%
ACSSuT	1	2
BLEE	1	2
AmpC	1	2

Cuadro 8. Especie relacionada al fenotipo de resistencia

Fenotipo de Resistencia	Especie
ACSSuT	Porcino
BLEE	Ave
AmpC	Cobayo

V. DISCUSIÓN

La salmonelosis es una de las toxiinfecciones alimentarias más importantes, ocasionando así un gran problema de salud pública. Esta es la razón principal por la cual *Salmonella* es motivo de estudio y vigilancia en todo el mundo, esto sumado a la aparición de un número cada vez mayor de cepas multiresistentes (De la Tore, 2006).

Se sabe que la aparición de resistencia de *Salmonella* a los antibióticos en diferentes regiones del mundo está relacionado con el abuso en la aplicación de estos agentes para el tratamiento en humanos; esta resistencia viene creciendo aceleradamente (algunos países han presenciado un aumento de 20 veces en los años noventa comparado con los ochenta) al parecer, debido a la administración de antimicrobianos en producciones pecuarias (WHO, 2004).

La propagación de múltiples bacterias patógenas resistentes a los antimicrobianos ha sido reconocida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), y la organización mundial de salud (OMS), como un serio problema global de salud humana y animal. El desarrollo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos no es un fenómeno ni nuevo, ni inesperado. Esta es, sin embargo, una situación problemática debido a la frecuencia con la que nuevos fenotipos de resistencia emergentes ocurren entre muchos patógenos bacterianos e incluso en los microorganismos comensales (OIE, 2008).

La presión selectiva ejercida por factores externos, como el mal uso e incluso abuso de los antibióticos en medicina humana, veterinaria o agricultura, junto a los diversos mecanismos de resistencia y transferencia genética que poseen las bacterias, contribuyen considerablemente a esta situación. El uso indiscriminado se torna uno de los principales factores determinantes de esta resistencia, principalmente en locales en donde la ocurrencia del agente/enfermedad es frecuente (De Toro, 2013).

Este problema es un importante motivo de preocupación en salud pública y son muchos los esfuerzos que deben de hacerse para controlar y lograr una contención de dicha resistencia y diseminación. Por ello, el desarrollo de esta tesis ha aportado resultados importantes en la vigilancia de la resistencia a antibióticos en el género *Salmonella* presentes en diversos animales; ha permitido evaluar la presencia de aislados de *Salmonella* portadores de mecanismos emergentes de resistencia, tales como fenotipos β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas tipo AmpC y fenotipos de pentaresistencia ACCSuT.

La resistencia a β -lactámicos en *S. enterica* se debe principalmente a la adquisición de enzimas β -lactamasa, siendo destacables las BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) y las de tipo AmpC (β -lactamasas tipo AmpC plasmídica). La diseminación de este tipo de resistencias de manera horizontal está mediada por elementos genéticos móviles o movilizables, como plásmidos, transposones e integrones (De Toro, 2011).

La presencia de β -lactamasas de tipo BLEE o AmpC ha sido ampliamente descrita en enterobacterias como *E.coli* o *Klebsiella* (Coque *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2012). Sin embargo, la prevalencia de este tipo de β -lactamasas es muy baja en *Salmonella*, con porcentajes de aproximadamente 0.2 – 7 %, pero compromete la eficacia del tratamiento con cefalosporinas de tercera generación en aquellos casos que lo requieren (Meakins *et al.*, 2008, Pardos de la Gándara *et al.*, 2011).

Del total de aislados de *Salmonella enterica* utilizados en el estudio, el 2% (1/50), presentó un fenotipo de resistencia compatible a BLEE, en un estudio en nuestro país se encontró un 2,6% de *Salmonella* productora de BLEE de un total de 235 muestras fecales provenientes del Instituto Nacional del Niño (Colquechagua *et al.*, 2015). Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), causan un grado de hidrólisis frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactámicos, este puede variar según el tipo de BLEE y el nivel de producción, pudiendo aparecer sensibles *in vitro* a algunos de estos antibacterianos (Paterson y Bonomo, 2005).

El CLSI antes del año 2010 recomendaba informar las cepas con fenotipos de BLEE, como resistente a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam indistintamente del valor del halo de inhibición mientras que la EUCAST recomendaba interpretar como intermedio un resultado sensible y como resistente un resultado intermedio.

En el año 2010 se modificaron los puntos de corte de las cefalosporinas y aztreonam y efectuaron una nueva recomendación consistente en informar la sensibilidad de los aislados con BLEE según los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad *in vitro* independientemente del mecanismo de resistencia (CLSI, 2010 y EUCAST, 2011). La detección de un aislado de *Salmonella enterica* compatible con BLEE es un importante motivo de preocupación de salud pública.

Las enzimas AmpC plasmídicas se han descrito en todos los continentes, con una prevalencia variable según el microorganismo, del tipo de enzima y del área geográfica. En general, la prevalencia de estas enzimas suele ser baja (menor al 2% en las enterobacterias), aunque se ha reportado una tendencia al incremento (Calvo J. *et al.*, 2011).

En el estudio, se detectó un porcentaje de 2 % (1/50) positivo a β -lactamasa AmpC, en Costa Rica, Tijerino *et al.*, 2016, reportó la presencia del 0.5% (9/1785) aislados de *salmonella enterica* con fenotipo AmpC plasmídica. El hallazgo de este tipo de enzimas, tiene relevancia clínica indiscutible, más aún, cuando se han encontrado mecanismos de resistencia asociados. Muchos laboratorios no determinan la presencia de AmpC debido, entre otras causas, a que se requieren reactivos no disponibles de manera rutinaria en el laboratorio clínico. Es importante recalcar que las enzimas AmpC, se asocian a fracasos terapéuticos, por lo que es importante su investigación empleando métodos para detección fenotípica y haciendo lectura interpretada del antibiograma (Martínez, 2009).

La resistencia a cefoxitín (a pesar de no ser 100% específica) en bacterias como *Salmonella enterica*, que no poseen naturalmente el gen AmpC, constituye un indicio de la presencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas con importancia epidemiológica por su potencial de diseminación. La detección también es importante para el monitoreo de bacterias con AmpC natural que durante el tratamiento con cefalosporinas se tornan resistentes, o en casos de cepas productoras de BLEE conjuntamente con AmpC.

En cualquier caso, es esencial que los laboratorios clínicos microbiológicos incluyan como ensayo de rutina la detección fenotípica de β lactamasas tipo AmpC (Martínez, 2009).

En los 50 aislados estudiados se encontró un 2% del fenotipo de resistencia ACSSuT (1/50), la presencia de este fenotipo dificulta la elección del tratamiento de este agente, se han observado estudios en España, donde se han detectado que el 29.5% de los 280 aislados de *Salmonella enterica* recogidos en hospitales presenta este fenotipo (De Toro *et al.*, 2013); en un estudio en Brasil se encontró que el 18.2% (37/203) de aislados de *Salmonella enterica* en granjas de aves presenta este fenotipo de pentaresistencia (Matiello, 2013).

Entre los antibióticos más utilizados para el tratamiento de infecciones producidas por *Salmonella enterica* figura la amoxicilina – ácido clavulánico, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas, pero la aparición de mecanismos de resistencia a dichos antibióticos limita las opciones terapéuticas. La resistencia a fluoroquinolonas resulta todavía infrecuente en *Salmonella enterica*, quizás debido a que supone un alto coste energético para la bacteria (O`Regan *et al.*, 2010); por lo tanto la resistencia intermedia encontrada en ciprofloxacino en 2 aislados (4%), debe ser observada, ya que porcentajes de resistencia intermedia sirven como señales de alerta para una mejor vigilancia con relación al surgimiento de cepas resistentes.

En el estudio se encontró un porcentaje de resistencia de (10%) para Ceftazidima, (2%) para Cefotaxima y (4%) para Ceftriaxona, siendo estas, cefalosporinas de tercera generación. Si bien los porcentajes encontrados no son altos, es preocupante el incremento de aislados de *Salmonella enterica* resistentes a algunos de los antibióticos utilizados para el tratamiento (De Toro *et al.*, 2011).

El panorama de resistencia observado en el presente estudio compromete las opciones terapéuticas de primera elección instituidas para la fiebre tifoidea (Enfermedad causada por serovares tifoideas de *Salmonella enterica*). El cloranfenicol, aún es la droga de elección para el tratamiento de la fiebre tifoidea debido a su bajo costo y respuesta terapéutica satisfactoria. Los resultados señalaron resistencia elevada de 94%(47/50) para el cloranfenicol, lo que demuestra que el estándar de sensibilidad a cloranfenicol ha cambiado con el paso de los años lo que podría significar un riesgo para la terapéutica de la enfermedad y la salud pública (Costa y Hofer, 1971; Ewing, 1986).

La resistencia progresiva de la *Salmonella* a los antimicrobianos de primera elección terapéutica, principalmente al cloranfenicol, ha sido descrita en diversos lugares del mundo, tales como: México, India, Vietnam, Tailandia, Corea y Perú. En estos países también han sido descritos aislados esporádicos de *Salmonella* resistentes a la ceftriaxona y al ácido nalidíxico (Rowe *et al.*, 1997). En el estudio, adicionalmente a la resistencia encontrada al cloranfenicol, también se reportó resistencia al ácido nalidíxico de 38% (19/50) y a la ceftriaxona de 4% (2/50).

Los otros porcentajes de aislados resistentes a tobramicina (72%), oxitetraciclina (62%), cloxacilina (42%), neomicina (40%), ácido nalidíxico (38%), estreptomicina (28%), ampicilina (26%) y amoxicilina-ácido clavulánico (22%), debe ser observada, ya que los porcentajes de resistencia sirven como señales de alerta para una mejor vigilancia con relación al surgimiento de cepas resistentes. El incremento de *Salmonella enterica* multirresistente a los antibióticos, es un problema de importancia clínica; se han observado porcentajes altos de resistencia a tetraciclinas (58%), ampicilina (55%), estreptomicina (46%), cloranfenicol (25%), amoxicilina-ácido clavulánico (21%), en 114 aislados de *Salmonella enterica*, (De Toro *et al.*, 2013).

Uno de los factores más prominentes que causan esta resistencia, es el uso indiscriminado de antimicrobianos de forma empírica y la automedicación sin una investigación para el diagnóstico adecuado de laboratorio, sea por falta de estructura y condiciones, sea por desinformación /negligencia por parte de los profesionales de salud (Fernandes y Rebeiro, 2000).

Históricamente muchas infecciones se pudieron tratar con éxito basándose en la experiencia de la clínica pasada (es decir, la terapia empírica). Sin embargo, esto se ha convertido más en la excepción que en la regla. Se ha observado resistencia prácticamente a varios antibióticos actualmente aprobados para su uso en medicina clínica humana y veterinaria. Esto, combinado con la variedad de antibióticos actualmente disponibles, hace de la selección de un antibiótico apropiado una tarea cada vez más difícil. Esta situación ha hecho a los clínicos más dependientes de los datos de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos *in vitro* y pone en relieve la importancia del laboratorio de diagnóstico en la práctica clínica (OIE, 2008).

La estandarización y homologación de las diversas metodologías de ensayo de sensibilidad frente a antibióticos, utilizadas en el control epidemiológico de la resistencia a los compuestos antibióticos, constituyen un factor clave si se pretende comparar datos entre los diferentes programas nacionales e internacionales de seguimiento de los países miembros de la OIE. Resulta esencial que los métodos de ensayo de sensibilidad a los antibióticos generen resultados reproducibles en laboratorios de uso diario y que los datos puedan ser comparables con los resultados obtenidos por un método patrón de referencia conocido como la “norma de oro”. En ausencia de métodos estandarizados o de procedimientos de referencia, los resultados de sensibilidad obtenidos en laboratorios diferentes no pueden compararse con fiabilidad. El método utilizado en la selección de las muestras para su inclusión en los programas de vigilancia de la resistencia a los antibióticos, así como los métodos utilizados para el aislamiento bacteriano primario, son también factores importantes que deben estandarizarse y homologarse para permitir una comparación directa de los datos entre las diferentes regiones (OIE, 2003).

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se han convertido en procedimientos de rutina en la práctica clínica y la información generada a partir de ellas es fundamental para la vigilancia de los perfiles de sensibilidad y la detección de nuevos patrones de resistencia por el laboratorio. El uso de estas pruebas en *Salmonella enterica* aporta información importante en el control de la enfermedad y vigilancia.

V. CONCLUSIONES

1. De un total de 50 cepas de *Salmonella enterica* se observó la presencia del 2% de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).
2. La presencia de betalactamasas tipo AmpC fue del 2% del total de cepas de *Salmonella enterica* presentes en este estudio.
3. La presencia de cepas de *Salmonella enterica* con fenotipo de penta-resistencia (ACSSuT), fue del 2%.

VI. LITERATURA CITADA

1. **Ángel-Díaz M, Ramón-Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. 2009.** *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicentrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 27:503-10.
2. **Alós J. 2003.** Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21, 261-267; quiz 268,272.
3. **Ambler R.P. 1980.** The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289(1036), p. 321-331.
4. **Baptista F, Alban L, Ersboll A, Nielsen L. 2009.** Factors affecting persistence of high Salmonella serology in Danish pig herds. *Prev Vet Med*; 92: 301-308
5. **Baquero F, Álvarez C, Martínez J. 2009.** Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environmental Microbiology Reports* 1, 469-476.
6. **Baquero F, Garau J. 2010.** Prudent use of antimicrobial agents: revisiting concepts and estimating perspectives in a global world. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28, 487-488
7. **Bean D, Livermore D, Hall L. 2009.** Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 10088-1093.
8. **Bello J, García MI, López de Cerain A. 2000.** Fundamentos de seguridad alimentaria (aspectos higiénicos y toxicológicos). Navarra: Ediciones Eunate.
9. **Berens C, Hillen W. 2003.** Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* 270, 3109-3121.

10. **Biedenbach D, Toleman M, Walsh T, Jones R. 2004.** Analysis of salmonella spp. With resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diag Microbiol Infect Dis*, 2006; 54:13-21.
11. **Borch E, Nesbakken T, Christensen H. 2002.** Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*; 30:9-25.
12. **Bradford PA. 2001.** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*; 14:933-51
13. **Brock T. 1999.** Robert Koch: a life in medicine and bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC.
14. **Buckley M. 2009.** Antibiotic Resistance: an ecological perspective on an old problema. Edited by A. A. o. Microbiology. Washington DC, USA: American Society for Microbiology.
15. **Bush K, Jacoby G.A, Medeiros A. A. 1995.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1211-1233.
16. **Bush, K., Jacoby, G. A. 2010.** Updated functional classification of β -lactamases *Antimicrob Agents Chmother* 54, 969-76.
17. **Bustos NS, Cortés LF, Domínguez CA, Mendoza LA. 2010.** Medición de la carga de enfermedad en una entidad promotora de salud de Colombia año 2008. Bogotá-Colombia. (tesis especialización). Colombia. Universidad de Rosario.
18. **Caffer M, Terragno R. 2001.** Manual de Procedimientos para la Caracterización de *Salmonella*. Instituto Nacional De Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires.
19. **Caffer MI, Terragno R, Binsztein N. 2008.** Manual de procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Salmonella spp.* Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Carlos Malbrán”, Buenos Aires, Argentina. Centro Regional de Referencia Del WHO Global Salm Surv para América del Sur.

20. **Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. 2011.** Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos. Segunda edición..
21. **Calvo J, Martínez Martínez, 2009.** Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27, 44-52.
22. **Campos J, Pérez Vázquez M, Oteo. 2010.** Las estrategias internacionales y las campañas para promover el uso prudente de los antibioticos en los profesionales y los usuarios. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28, 50-54
23. **Canton R, Gonzáles Alba J.M, Galán J. C. 2012.** CTX-M Enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol* 3, 110.
24. **Cantón R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. 2008.** IRT and CMT β -lactamases and inhibidor resistance. *Clin Microbiol Infect.*; 14 Suppl 1:s53-62.
25. **CE. 2000.** Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Food-Borne Zoonoses. [Internet], [08 de agosto del 2013]. Disponible en: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out32_en.pdf.
26. **Chopra I. 1994.** Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 637-640.
27. **Chopra I, Roberts M. 2001.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232-260.
28. **Colquechagua Aliaga, Carlos Sevilla Andrade, Edgar Gonzales Escalante, 2015.** Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el instituto nacional de salud del niño, Lima-Perú.
29. **Coma J. 2001.** Control de *Salmonella* en carne de porcino: Efecto de la alimentación animal. CVII Curso de Especialización FEDNA sobre Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Madrid.
30. **Comité de Antibiogramme de la société Francaise de microbiologie. Recommandations 2010:** Disponible en [http:// www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/casfm_2010.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/casfm_2010.pdf).

31. **Corral J. L, Perea E.J. 1992.** *Salmonella*. Barcelona: Ed. Dogma.
32. **Costa GA, Hofer E. 1971.** Resistência ao cloranfenicol de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em alguns Estados do Brasil. Hospital.fev; 79(2):229-42.
33. **CLSI (Clinical a Laboratory Standars Institute). 2009.** Pefomance standards for antimicrobial disk susceptibilty test; approved estándar M2-A10. Wayne, Pennsylvania.
34. **CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2010.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Tewentieth Informational Suppement. CLS document M100-S20.
35. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eighteenthin formational supplement M10-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
36. **D'Aoust JY, Maurer J. 2007.** *Salmonella* species. En: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Third edn. (Doyle, M.P. & Beuchet, L. R., eds.). ASM Press-Washington, D.C. pp. 187-236.
37. **Davies RH, McLaren IM, Bedford S. 1999.** Observations on the distribution of *Salmonella* in pig abattoirs. Veterinary Record; 145(23):655–661.
38. **De la Torre Martinez. 2006.** Caracterización molecular fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de *Salmonella* de origen porcino.
39. **De Toro, Seral C, Rojo Bezares B, Torres Carmen, Castillo J, Sáenz Y. 2013.** Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. Enferm Infecc Microbial Clin; 32(1):4-10.
40. **De Toro M, Sáenz Y, Cercenado E, Rojo Bezares B, García Campello M, Undabeitia E. 2011.** Genetic characterization of themechanisms of resistanceto amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* fromthree Spanish hospitals. Int Microbiol; 14 (3):173–81.
41. **De Toro M. 2013.** Resistencia a β -láctamicos y fluoroquinolonas en *salmonella enterica*. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica. Tesis Doctoral con Mención Internacional. Logroño: Universidad De La Rioja.

42. **Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. 2001.** Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y fronteras. Zaragoza: Editorial Acribia: Pag: 785.
43. **Drawz S, Bonomo R. A. 2010.** Three decades of β -lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev 23, 160-201.
44. **Edwards P, Edwing WH. 1972.** Identification of Enterobacteriaceae. Editorial Minneapolis.Tercer Ed. Pag: 258.
45. **Errecalde J. O. 2004.** Uso de antimicrobianos en animales de consume. Incidencia del desarrollo de Resistencia en salud pública. Edited by F. P. y. S. Animal. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.
46. **Erickson MC, Islam M, Shepard C, Liao J, Doyle MP. 2004.** Reduction of Escherichia coli 0157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken manure by Larvae of Black Soldier Fly. Journal of Food Protection; 67(4):685-690.
47. **EUCAST (European committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). 2011.** Available in: <http://www.eucast.org>.
48. **Ewing WH. Edwards and Ewing's. 1986.** Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing; 536 p.
49. **Fábrega A, du Merle L, Le Bouguénec Ch, Jiménez de Anta t, and Vila J. 2009.** Repression of invasion genes and decreased invasion in a high-level fluoroquinolone-resistant *Salmonella Typhimurium* Mutant. PLoS ONE. 25; 4(11):8029.
50. **Fernandes AT, Ribeiro Filho N. 2000.** Infecção hospitalar. In: Fernandes AT, Fernandes MAV, Ribeiro Filho N, editores. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu. p. 163- 214.
51. **Ferran Navarro, Jorge Calvo, Rafael Cantón, Felipe Fernandez-Cuenca y Beatriz Mirelis. 2011.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gram-negativos.
52. **Fica A, Fernández A, Prat P. Figueroa O, Gamboa R, Tsunekawa I, Heitman I. 1997.** *Salmonella* Enteritidis, un patógeno emergente em Chile. Rev Méd Chile; 544-51 pp
53. **Forsythe SJ. 2003.** Alimentos seguros: microbiología. Zaragoza: Editorial Acribia. Primera edición, 410 págs.

54. **Frazier WC, Westhoff DC. 1993.** Microbiología de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia. Cuarta edición.
55. **Garriga M, Marcos B, Aymerich T, Hugas M. 2003.** Prospectiva de aplicación de altas presiones para la minimización de riesgos asociados a *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en embutidos madurados en frío. Eurocarne; 121(2):93-99.
56. **Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, and Hooper DC. 2006.** Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. Clin Infect Dis 43: 297-304.
57. **Gledel J. 1995.** En microbiología alimentaria, pp. 52-66. Editado por J. F. M. y J. Z. C.M. Bourgeois. Zaragoza: Ed. Acribia.
58. **Giovannacci I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Vendevre JL, Carlier V, Ermel G. 2001.** Tracing of *Salmonella* spp. in two pork slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. Journal of Applied Microbiology; 90: 131-147.
59. **Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. 2006.** Resistance to fluoroquinolones in Salmonella: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. Microbes Infect 8, 1937-1944.
60. **Grimont PA, Weill FX. 2007.** Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* – Instituto Pasteur, París. Francia.
61. **Guerra B, Junker E, Helmuth R. 2004.** Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. Antimicrob Agents Chemother 48, 2712-2715.
62. **Guerri ML, Aldueña A, Echeita A, Rotger R. 2004.** Detection of integrons and antibiotic-resistance genes en *salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated with resistance to ampicillin and variable suceptibility to amoxicillin-clavulanate. Int J Antimicrob Agents. 24:327-33
63. **Goldbach SG, Alban L. 2006.** A cost-benefit analysis of salmonella-control strategies in Danish pork production. Prev Vet Med, 77: 1-14
64. **Hawkey P.M. 2003.** Mechanisms of quinolone action and microbial response. J Antimicro Chemother 51, 29-35

65. **Hurd HS, McKean JD, Wesley IV, Karriker LA. 2001.** The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *Food Prot*; 64: 939-44.
66. **ICMSF. 1998.** Microorganismos de los alimentos: Características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Editorial Acribia.
67. **ISO 6579. 2002.** Microbiology - General guidance on methods for the detection of *Salmonella*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 4rd ed.
68. **Jacoby G.A. 2009.** AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22, 161-82.
69. **Knothe H., Shah P, Krcmery V, Antal M. y Mitsuhashi S. 1983.** Transferable resistance to cefotaxima, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*. USA. *Clin Infect Dis.*, vol. 11. P. 315-317.
70. **Kong K.F, Schneper L, Mathee K. 2010.** B-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 118, 1-36.
71. **Lawson L, Jensen J, Christiansen P, Lund M. 2009.** Cost-effectiveness of *salmonella* reduction in Danish abattoirs. *Inter J Food Microbiol*, 134:126-132
72. **Leshner G.Y, Froelich E.J, Gruett M.d, Bailey J.H, Brundage R.P. 1962.** 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* 91, 1063-1065.
73. **Lezameta L, Gonzales Escalante E, Tamariz J. 2010.** Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de β lactamasa de espectro extendido. Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.*, vol. 27, n° 3, p. 345-51.
74. **Livermore DM. 2008.** Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect*; 14:3-10.
75. **Ly K. T, Casanova J.E. 2007.** Mechanisms of *salmonella* entry into host cells. *Cell Microbiol* 9, 2103-2111.
76. **MacQuinston JR, Fields P, Tauxe RV, Logsdon JM. 2008.** Molecular phylogeny of the *Salmonellae*: relationship among *Salmonella* species and subspecies determined

77. **Marín M, Gudiol, F. 2003.** B-lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21, 42-55.

78. **Martínez Martínez L, Ruiz de Alegria C. 2009.** Escherichia coli resistente a gentamicina y sensible a amikacina. En atlas del antibiograma, pp. 141-143. Editado por J. I. Alós, R. Cantón, L. Martínez- Martínez y J. Vila: Biomérieux University.

79. **Martínez Rojas Dianny Del Valle.2009.** β -lactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [Internet]. Dic [citado 2016 Mayo 08] ; 29(2): 78-83. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200003&lng=es.

80. **Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. 2010.** Prevalence of acquired AmpC β -lactamasas in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect*; 16:472-6.

81. **Mattiello Samara Paula, 2013.** Caracterização da resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* enterica provenientes de materiais de origem avícola, Porto Alegre-Brasil.

82. **Mattar S, Martínez P. 2007.** Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): Detección, impacto clínico y epidemiología. Colombia. *Infectio*. vol.1, n° 1, p. 23-35.

83. **McGhie E.J, Brawn L.C, Hume P.J, Humphreys D, Koronakis V. 2009.** *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* 12, 117-124.

84. **Mella S.M, Acuña G, Muñoz M, Pérez C, Labarca J, Gonzales G, Bello H, Dominguez M, Zemelman R. 2000.** Quinolonas: aspectos generals sobre su estructura y clasificación. *Revista chilena de Infectología* 17, 53-66.

85. **Meakins S, Fisher I.S.T, Berghold C, Germer Smidt P, Tschape H, Cormican M, Luzzi I, Schneider F, Wannett W, Coia J, Echeita A, Threlfall E.J. 2008.** Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: A report from the Enter-net international surveillance network. *Microbial Drug Resistance* 14.

86. **Michael G.B, Butaye P, Cloeckert A, Schwarz S. 2006.** Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *salmonella*: an update. In *Microbes Infect*, pp. 1898-1914. France.
87. **Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa R, Navarro F, Coll P, 2006.** A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC B-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 24: 370-2
88. **Mossel D, Moreno B, Struijk C. 2002.** En *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Ed. Acribia.
89. **Navarro F, Miró E, Mirelis B, 2010.** Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;28:638-45
90. **Navarro F, Miró E, Mirelis B.2002.** Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 20: 225-34.
91. **Nordmann P and Poirel L. 2005.** Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in enetrobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 56: 463-9.
92. **Nugent R, Back E, Beith A. 2010.** The race against drug resistance. En *When medicine fail, a global push to fight drug resistance*. Editado por C. f. G. D. s. D. R. W. Group: Center for global Developments Drug Resistance Working Group.
93. **OIE (World Organisation for Animal Health), 2003.** OIE International Standard son Antimicrobial Resistance. OIE, Paris, France.
94. **OIE, 2008.** Manual de la OIE sobre animals terrestres-métodos de laboratorio para los ensayos de sensibilidad de las bacterias frente a los antimicrobianos.
95. **O'Regan E, Quinn T, Frye JG, Pagès JM, Porwollik S, Fedorka-Cray PJ. 2010.** Fitness costs and stability of a high-level ciprofloxacin resistance phenotype in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: Reduced infectivity associated with decreased expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes. *Antimicrob Agents Chemother.*;54:367-74.
96. **Plecchi L, Bartolini A, Riccobono E, Fernández C, Mantella A, Magnelli D, Mannini D, Strohmeier M, Bartalesi F, Rodríguez H, Roodríguez H, Gotuzzo E, Rossolini G.M. 2012.** Quinolone resistance in absence of selective pressure: the experience of a very remote community in the Amazon forest. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1 790.

97. **Palomar M, Álvarez Lerma F, Olaechea P, Insausti J, López Pueyo MJ.** Informe ENVIN 2008. Disponible en: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/ENVIN-UCI>.

98. **Pardos de la Gándara M, Seral C, Castillo García J, Rubio Calvo C, Weill F.X.** 2011. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing *Salmonella enterica* isolates in Saragosa, Spain (2001-2008). Microb Drug Resist 17, 207-213.

99. **Parra M; Durango J y Máttar S,** 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ Cordova. 7 (2):235-340.

100. **Partridge S.R, Tsafnat G, Coiera E, Iredell J.R.** 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev 33, 757-784.

101. **Partridge S.R.** 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews 35, 820-885.

102.. **Paterson D.L, Bonomo R.A.** 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update Clin Microbiol Rev 18, 657-86.

103.. **Perozo A, Catellano M,** 2005. Pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Maracaibo: Monografía. Sociedad Venezolana de Microbiología capítulo Zulia.

104.. **Perreten V, Boerlin P.** 2003. A new sulfonamide resistance gene (sil3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. Antimicrob Agentes Chemother 47, 1169-1172.

105. **Pires S.M, de Knecht L, Hald T.** 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *salmonella* infections in the European Union. Editado por DTU National Food Institute y European Food Safety Authority (EFSA).

106. **Poirel L, Cattoir V, Nordmann P.** 2012. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. Front Microbiol 3, 24.

107. **Ramírez M.S, Tolmasky M.E.** 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat 13, 151-171.

108. **Robicsek A.J, Strahilevitz G.A, Jacoby M, Macielag D, Abbanat K. 2006.** Fluoroquinolone modifying enzyme: a novel adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med* 12: 83-88.
109. **Rodriguez Martínez J.M. 2005.** Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23, 25-31.
110. **Rowe B, Ward LR, Threlfall EJ. 1997.** Multidrug-resistant *Salmonella typhi*: a worldwide epidemic. *Clin Infect Dis. Jan 24 Suppl 1*:S106-9.
111. **Samara Paula Mattiello, 2013.** Caracterização da resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella enterica* provenientes de materiais de origem avícola.
112. **Sánchez Ligia, Corrales Lucía. 2005.** Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas.
113. **Sanders CC, Sanders WE, 1979.** Emergence of resistance to cefamandole: posible role of cefoxitin inducible β lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 15: 792-7.
114. **Schlumberger M.C, Hardt W.D. 2006.** Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell s strings. *Curr Opin Microbiol* 9, 46-54
115. **Schwartz KJ. 1991.** Salmonellosis in swine. *Compend Contin Educ* 13(1): 139-148.
116. **Shaw W. V. 1984.** Bacterial resistance to chloramphenicol. *Br Med Bull* 40, 36-41.
117. **Skold O. 2001.** Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* 32, 261-273.
118. **Silva J. 2000.** *Salmonella* Enteritidis un patógeno emergente de origen aviario. *Rev Cs Salud*; 4:25-36.
119. **Stephen JM, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. 2003.** SENTRY Program Participants Group. *Salmonella* bloodstream infections: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents*, 22:395-405.
120. **Suárez C, Gudiol F. 2009.** Antibioticos β lactamicos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 27, 116-129.

121. **Sun L, Kleyn E.Y, Laxminarayan R. 2012.** Seasonality and temporal correlation between community antibiotic use and resistance in the United State. *Clinical Infectious Diseases* 55, 687-694.

122. **Swanenburg M, Urlings HAP, Snijders JMA, Keuzenkamp DA, Knapen F. 2001.** *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*; 70: 2433-254.

123. **Theuretzbacher U. 2001.** Resistance drives antibacterial drug development. *Current Opinion in Pharmacology* 11, 433-438.

124. **Tijerino Ayala A, Bolaños Acuña HM, Acuña Calvo MT, Vargas Morales JL, Campos Chacón E. 2016.** Emergencia de β -lactamasa AmpC plasmídica del grupo CMY-2 en *Shigella sonnei* y *Salmonella spp.* en Costa Rica, 2003-2015. *Rev Panam Salud Publica*;40(1):70–75.

125. **Tillier ER, Collins RA. 2000.** Genome Rearrangement by replication-directed translocation. *Nat. Genet.* 26:195-197.

126. **Torres C, Moreno M.Á, Zarazaga M. 2010.** Prudent use of antimicrobial: not just for humans. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28, 669-671.

127. **Uribe C, Suárez MC. 2006.** Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colomb. Med.* 2006 June; 37(2): 151-158. [Internet], [15 julio 2012] .Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342006000200011&lng=en

128. **Van Hoek A.H, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts A.P, Aarts H.J. 2011.** Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2, 203.

129. **Vicente D, Pérez Trallero E. 2010.** Tetracycline, sulfonamides, and metronidazole. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28, 122-130.

130. **Willeberg P. 2000.** *Salmonella* in pork (SALINPORK): Pre-harvest and Harvest control options based on Epidemiologic, Diagnostic and Economic Research. European Commission. Final Report.

131. **WHO. 2004.** 1st Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneva. [Fecha de acceso: 10 de Enero de 2012] URL: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/>

132. **Winokur P, Canton R, Casellas J, Legakis N. 2001.** Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype of isolates from Europe the Americas and the Western Pacific Region. *Low. Clin Infect Dis.*, Vol. 32 (Suppl.2), p. 94-105.

133. **Yim G, Huimi Wang H, Davies J. 2007.** Antibiotics as signaling molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of Biological Sciences* 362, 1195-1200.

ANEXO 1. Resultados e interpretación de la prueba de Kirby Bauer

CEPA	ANTIBIOTICO	ACIDO		AMIKACINA		AMOXICILINA-ACIDO CLAVULANICO		AMPICILINA		AZTREONAM		CEFALOTINA		CEFEPIME		CEFOTAXIMA		CEFOXITINA		CEFTAZIDIMA	
		HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESU LT	RESULT	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)
E9-1	COBAYO	6	R	28	S	6	R	6	R	30	S	20	S	30	S	32	S	30	S	22	S
E10-2	COBAYO	6	R	24	S	26	S	20	S	28	S	20	S	18	S	30	S	26	S	18	I
E11-2	COBAYO	16	I	24	S	30	S	20	S	28	S	12	R	24	S	30	S	26	S	20	I
E12-3	PORCINO	6	R	28	S	6	R	6	R	30	S	20	S	32	S	32	S	6	R	28	S
E13-1	COBAYO	6	R	30	S	6	R	6	R	34	S	20	S	30	S	30	S	34	S	26	S
E14-2	COBAYO	6	R	24	S	6	R	20	S	22	S	20	S	26	S	30	S	24	S	22	S
E17-2	COBAYO	18	I	24	S	40	S	12	R	30	S	26	S	32	S	30	S	30	S	26	S
E18-3	COBAYO	22	S	28	S	30	S	12	R	26	S	22	S	28	S	36	S	26	S	22	S
E20-2	COBAYO	24	S	24	S	30	S	22	S	24	S	20	S	26	S	36	S	14	I	20	I
E24-3	COBAYO	6	R	26	S	34	S	24	S	8	R	28	S	30	S	32	S	26	S	28	S
E26-2	BOVINO	16	I	26	S	6	R	8	R	6	R	6	R	8	R	28	S	12	R	10	R
E27-2	COBAYO	6	R	26	S	6	R	10	R	10	R	6	R	6	R	30	S	8	R	16	R
E28-2	COBAYO	6	R	28	S	6	R	10	R	12	R	6	R	28	S	26	S	12	R	16	R
E29-2	COBAYO	6	R	24	S	30	S	22	S	32	S	24	S	20	S	32	S	28	S	26	S
E30-2	AVE	16	I	36	S	30	S	20	S	38	S	22	S	44	S	40	S	40	S	32	S
E31-3	AVE	6	R	24	S	36	S	18	S	28	S	22	S	32	S	36	S	32	S	24	S
E36-3	COBAYO	6	R	26	S	32	S	18	S	30	S	24	S	28	S	18	I	32	S	24	S
E37-3	COBAYO	22	S	28	S	32	S	24	S	30	S	24	S	30	S	36	S	28	S	26	S
E38-1	COBAYO	6	R	22	S	30	S	18	S	28	S	24	S	24	S	30	S	30	S	24	S
E39-2	COBAYO	6	R	26	S	30	S	20	S	26	S	24	S	30	S	38	S	30	S	24	S
E40-2	COBAYO	20	S	26	S	32	S	28	S	26	S	24	S	30	S	36	S	30	S	24	S
E42-2	AVE	20	S	22	S	32	S	20	S	22	S	24	S	30	S	32	S	28	S	28	S
E43-2	COBAYO	6	R	28	S	36	S	18	S	32	S	20	S	36	S	34	S	36	S	26	S
E44-1	AVE	6	R	22	S	6	R	6	R	20	I	6	R	24	S	28	S	16	I	20	S

E45-2	PORCINO	6	R	30	S	6	R	6	R	34	S	22	S	18	S	30	S	32	S	26	S
E46-2	AVE	6	R	26	S	30	S	18	S	36	S	22	S	36	S	28	S	40	S	28	S
E47	AVE	6	R	28	S	6	R	6	R	10	R	6	R	16	I	6	R	6	R	16	R
E50	PORCINO	6	R	34	S	6	R	6	R	32	S	24	S	32	S	36	S	34	S	28	S
E51	COBAYO	20	S	28	S	30	S	22	S	26	S	24	S	28	S	34	S	30	S	26	S
3C	PORCINO	20	S	20	S	30	S	12	R	30	S	22	S	20	S	26	S	28	S	22	S
7C	PORCINO	24	S	20	S	30	S	18	S	28	S	20	S	26	S	24	S	32	S	20	S
10V	PORCINO	22	S	22	S	30	S	20	S	28	S	22	S	30	S	26	S	30	S	26	S
42L	PORCINO	20	S	20	S	30	S	18	S	28	S	24	S	26	S	24	S	32	S	22	S
48L	PORCINO	22	S	20	S	30	S	18	S	34	S	24	S	30	S	26	S	32	S	26	S
53C	PORCINO	22	S	20	S	30	S	20	S	28	S	20	S	26	S	26	S	30	S	20	S
61V	PORCINO	22	S	24	S	30	S	18	S	28	S	20	S	26	S	28	S	28	S	28	S
79C	PORCINO	20	S	20	S	30	S	16	I	28	S	22	S	28	S	28	S	32	S	20	S
71V	PORCINO	22	S	20	S	30	S	18	S	32	S	26	S	30	S	26	S	26	S	24	S
77L	PORCINO	22	S	20	S	30	S	20	S	28	S	20	S	28	S	26	S	22	S	20	S
77P	PORCINO	22	S	20	S	30	S	16	I	28	S	28	S	26	S	24	S	32	S	20	S
111V(C	PORCINO	18	I	20	S	30	S	18	S	28	S	22	S	30	S	28	S	30	S	24	S
117V	PORCINO	18	I	24	S	30	S	16	I	34	S	24	S	20	S	26	S	28	S	22	S
122V	PORCINO	20	S	20	S	30	S	18	S	28	S	22	S	28	S	30	S	30	S	26	S
150C																					
(150V)	PORCINO	24	S	20	S	30	S	20	S	30	S	22	S	30	S	24	S	28	S	24	S
162L	PORCINO	22	S	24	S	30	S	16	I	28	S	24	S	30	S	24	S	30	S	28	S
166P	PORCINO	22	S	20	S	30	S	16	I	28	S	18	S	26	S	26	S	6	R	24	S
168V	PORCINO	26	S	20	S	30	S	20	S	22	S	28	S	14	I	26	S	30	S	16	R
172V	PORCINO	22	S	22	S	30	S	20	S	28	S	20	S	22	S	28	S	30	S	22	S
172C	PORCINO	22	S	20	S	30	S	20	S	28	S	20	S	18	I	24	S	28	S	22	S
232L	PORCINO	22	S	24	S	30	S	20	S	28	S	20	S	24	S	26	S	10	R	22	S

ANTIBIOTICO	CEFTRIAXONA		CIPROFLOXACINO		CLORANFENICOL		CLOXACILINA		ESTREPTOMICINA		GENTAMICINA		NEOMICINA		OXITETRACICLINA		SULFATRIMETROPIN		TOBRAMICINA		
	CEPA	ESPECIE	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESUL T	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESUL T	HALO (mm)	RESU LT	HALO (mm)	RESUL T	HALO (mm)	RESUL T	HALO (mm)	RESUL T	HALO (mm)	RESUL T	
E9-1	COBAYO	28	S	32	6	R	R	6	R	20	S	26	S	6	R	20	S	14	I	10	R
E10-2	COBAYO	30	S	34	6	R	R	6	R	20	S	20	S	6	R	20	S	30	S	6	R
E11-2	COBAYO	12	R	24	12	R	R	6	R	18	S	20	S	10	R	18	I	28	S	8	R
E12-3	PORCINO	24	S	38	10	R	R	6	R	18	S	18	S	6	R	12	R	18	S	6	R
E13-1	COBAYO	28	S	36	12	R	R	6	R	6	R	16	S	6	R	12	R	20	S	6	R
E14-2	COBAYO	32	S	34	10	R	R	6	R	20	S	22	S	10	R	20	S	28	S	6	R
E17-2	COBAYO	32	S	34	8	R	R	12	I	18	S	20	S	20	S	16	I	6	R	14	I
E18-3	COBAYO	32	S	42	10	R	R	6	R	24	S	26	S	26	S	20	S	36	S	8	R
E20-2	COBAYO	32	S	40	8	R	R	16	S	24	S	24	S	24	S	16	I	28	S	12	R
E24-3	COBAYO	34	S	38	8	R	R	6	R	20	S	30	S	6	R	20	S	16	S	6	R
E26-2	BOVIINO	30	S	34	6	R	R	6	R	10	R	14	I	6	R	18	I	14	I	6	R
E27-2	COBAYO	32	S	38	8	R	R	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	14	I	6	R
E28-2	COBAYO	28	S	34	6	R	R	8	R	18	S	16	I	18	S	10	R	20	S	6	R
E29-2	COBAYO	30	S	36	6	R	R	6	R	24	S	26	S	6	R	22	S	14	I	6	R
E30-2	AVE	40	S	46	16	S	S	6	R	20	S	34	S	20	S	18	I	28	S	10	R
E31-3	AVE	40	S	32	12	R	R	6	R	22	S	24	S	12	R	18	I	18	S	6	R
E36-3	COBAYO	24	S	34	6	R	R	20	S	20	S	26	S	6	R	16	I	18	S	6	R
E37-3	COBAYO	30	S	36	6	R	R	20	S	22	S	28	S	20	S	18	I	34	S	18	S
E38-1	COBAYO	30	S	38	16	I	I	12	I	20	S	26	S	18	S	16	I	30	S	16	S
E39-2	COBAYO	34	S	34	6	R	R	8	R	22	S	22	S	6	R	18	I	28	S	6	R
E40-2	COBAYO	34	S	36	6	R	R	22	S	18	S	22	S	18	S	14	R	34	S	10	R
E42-2	AVE	34	S	40	12	R	R	16	S	22	S	22	S	18	S	16	I	30	S	8	R
E43-2	COBAYO	38	S	22	8	R	R	6	R	16	S	24	S	6	R	12	R	18	S	6	R
E44-1	AVE	28	S	20	6	R	R	6	R	16	S	20	S	6	R	14	R	6	R	6	R
E45-2	PORCINO	34	S	40	6	R	R	6	R	6	R	14	I	6	R	10	R	10	R	6	R

E46-2	AVE	30	S	24	S	6	R	12	I	16	S	22	S	6	R	18	I	18	S	6	R
E47	AVE	12	R	16	I	6	R	6	R	14	I	14	I	10	R	6	R	6	R	6	R
E50	PORCINO	40	S	42	S	10	R	6	R	6	R	20	S	12	R	26	R	26	S	10	R
E51	COBAYO	34	S	44	S	14	I	20	S	20	S	20	S	20	S	30	S	30	S	14	I
3C	PORCINO	24	S	30	S	6	R	16	S	14	I	20	S	16	I	24	R	24	S	14	I
7C	PORCINO	26	S	32	S	6	R	6	R	10	R	22	S	18	S	26	R	26	S	12	R
10V	PORCINO	26	S	38	S	6	R	16	S	12	I	24	S	18	S	26	R	26	S	14	I
42L	PORCINO	26	S	36	S	6	R	12	I	10	R	20	S	20	S	26	R	26	S	16	S
48L	PORCINO	26	S	30	S	6	R	16	S	10	R	20	S	18	S	26	R	26	S	16	S
53C	PORCINO	26	S	28	S	6	R	16	S	12	I	22	S	20	S	28	R	28	S	14	I
61V	PORCINO	26	S	32	S	6	R	14	S	12	I	24	S	20	S	26	R	26	S	14	I
79C	PORCINO	22	S	30	S	6	R	16	S	14	I	24	S	18	S	28	R	28	S	10	R
71V	PORCINO	24	S	34	S	6	R	12	S	12	I	22	S	16	I	28	R	28	S	8	R
77L	PORCINO	26	S	34	S	6	R	16	S	10	R	24	S	16	I	26	R	26	S	10	R
77P	PORCINO	26	S	30	S	10	R	16	S	8	R	22	S	26	S	24	R	24	S	8	R
111V (C)	PORCINO	24	S	36	S	6	R	14	S	10	R	24	S	18	S	24	R	24	S	10	R
117V	PORCINO	24	S	30	S	6	R	12	S	20	S	22	S	20	S	26	R	26	S	6	R
122V	PORCINO	22	S	34	S	6	R	16	S	24	S	26	S	20	S	26	R	26	S	16	S
150C (150V)	PORCINO	22	S	32	S	6	R	16	S	16	S	22	S	22	S	26	R	26	S	10	R
162L	PORCINO	24	S	30	S	6	R	12	S	10	R	22	S	20	S	28	R	28	S	12	R
166P	PORCINO	24	S	34	S	6	R	16	S	18	S	22	S	14	I	28	R	28	S	14	I
168V	PORCINO	26	S	40	S	6	R	16	S	28	S	24	S	18	S	26	R	26	S	14	I
172V	PORCINO	26	S	34	S	6	R	14	S	14	I	22	S	16	I	28	R	28	S	12	R
172C	PORCINO	26	S	38	S	10	R	14	S	10	R	16	S	10	R	26	R	26	S	12	R
232L	PORCINO	28	S	34	S	6	R	16	S	10	R	10	R	20	S	26	R	26	S	16	S

