



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *SALMONELLA*
ENTERICA NO-TYPHI PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS AMPC
MEDIADAS POR PLÁSMIDOS AISLADAS DE ESPECÍMENES FECALES
EN LA CIUDAD DE MÉXICO**

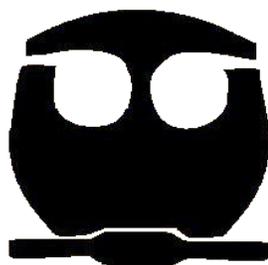
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

GRACIELA ROSAS ALQUICIRA



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Eduardo Bonilla Espinosa
Vocal	Estrella Cervantes García
Secretario	Fernando Jesús Tuz Dzib
Primer Suplente	Alejandro Camacho Cruz
Segundo Suplente	Luciano Hernández Gómez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Bacteriología en el Depto. de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Asesor del tema: QFB Fernando Jesús Tuz Dzib

Supervisor técnico: QFB Aida Leticia Reyes González

Sustentante: Graciela Rosas Alquicira

Agradecimientos

Este trabajo es dedicado con mucho cariño a las personas más importantes de mi vida que son mis papás y mis hermanos, de quienes agradezco infinitamente el apoyo, la confianza, los consejos y el entusiasmo que me brindaron a lo largo de mi carrera para llegar a la meta.

Quiero agradecerle a Dios por permitirme vivir este logro y por haberme brindado la fuerza para concluir este ciclo.

Quiero agradecer la asesoría de mi director de tesis el QFB. Fernando Tuz Dzib, así como la valiosa revisión de este trabajo por parte de la Dra. Beatriz Ruíz Palacios, la Dra. Luz Elena Cervantes y los miembros del jurado.

Así mismo, agradezco el gran esfuerzo de Lety, quien me enseñó, supervisó e invirtió tiempo para la realización de mi trabajo experimental. Además, quiero agradecer a mis compañeros y amigos del laboratorio de Bacteriología: Dulce, Claudia, Ayleen, Gabriel, Luis y Lucy, por su amistad y apoyo.

Muy especialmente quiero dedicar este trabajo a Alan, por su apoyo incondicional, su compañía y todo lo valioso que aporta a mi vida.

	Pág.
Índice	1
CAPÍTULO I	
Resumen	3
CAPÍTULO II	
Objetivos	4
CAPÍTULO III	
Antecedentes	
3.1 Enterobacterias	5
3.2 Género <i>Salmonella</i>	5
3.2.1 Microbiología y clasificación	5
3.2.2 Manifestaciones clínicas	6
3.2.2.1 Gastroenteritis	6
3.2.2.1.1 Patogénesis	7
3.2.2.1.2 Diagnóstico y tratamiento	7
3.3 Resistencia antimicrobiana	8
3.3.1 Antibióticos β -lactámicos	9
3.3.2 Resistencia a antibióticos β -lactámicos	9
3.4 β-lactamasas	10
3.4.1 β-lactamasas AmpC	12
3.4.1.1 Detección fenotípica	13
3.4.1.1.1 Ensayos en 3D usando extractos bacterianos	13
3.4.1.1.2 Ensayos de sinergismo y potenciación	14
3.4.1.2 Detección genotípica	14
CAPÍTULO IV	
Metodología Experimental	
4.1 Cepas bacterianas	15
4.2 Pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos	15
4.2.1 Método de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco	15
4.2.2 Método de CMI por el sistema VITEK Jr. 60	16

4.2.3 Método de CMI por prueba E	17
4.3 Identificación fenotípica de β-lactamasas AmpC	17
4.3.1 Ensayo en 3 ^a dimensión con extracto bacteriano	17
4.3.2 Ensayos de sinergismo y potenciación con AFB	18
4.4 Identificación genotípica de β-lactamasas AmpC por PCRm	19
4.4.1 Extracción del ADN bacteriano	19
4.4.2 Ensayo de PCRm	19
4.4.3 Secuenciación del producto de PCR	20
4.5 Electroforesis de campos pulsados	21

CAPÍTULO V

Resultados

5.1 Cepas bacterianas	23
5.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	23
5.3 Identificación fenotípica de β -lactamasas AmpC	27
5.4 Identificación genotípica de β -lactamasas AmpC por PCRm	29
5.5 Electroforesis de campos pulsados	29

CAPÍTULO VI

Discusión	31
------------------	----

CAPÍTULO VII

Conclusiones	34
---------------------	----

CAPÍTULO VIII

Referencias	35
--------------------	----

Resumen

Antecedentes: Varios estudios reportan que la resistencia a antibióticos de primera elección ha complicado el tratamiento de severas infecciones gastrointestinales producidas por *Salmonella*. Particularmente, la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido, esta asociado a la adquisición de plásmidos que transfieren genes que codifican β -lactamasas de tipo AmpC, principalmente CMY-2. Por lo cual, el objetivo de este estudio es detectar fenotípicamente y genotípicamente la producción de β -lactamasas en cepas de *Salmonella* aisladas en nuestro medio.

Métodos: Un total de 52 cepas de *Salmonella* aisladas de heces en un hospital de tercer nivel durante 2002 a 2007, fueron incluidas para el análisis. A estos aislados se les realizaron ensayos de susceptibilidad con un panel de 21 agentes antimicrobianos. Los aislados que presentaron resistencia a cefoxitina fueron probados en ensayos fenotípicos de 3ª dimensión con extractos bacterianos, pruebas de potenciación y sinergismo con ácido borónico, y para confirmar la presencia de los genes *ampC* se realizó un PCR múltiple. Los aislados positivos fueron comparados por electroforesis de campos pulsados para determinar su relación genética.

Resultados: *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis se aislaron con mayor frecuencia (19.2%), seguidos por *S. Agona* (9.6%) y *S. Newport* (5.8%), así como 20 diferentes serotipos menos comunes. Se encontró una resistencia del 19.2% (10/52) a cefalosporinas de espectro extendido, incluyendo cefoxitina, en los serotipos Typhimurium (50%), Newport (100%) y en los dos aislados Reading y Tumodi. Por PCR y secuenciación, las 10 cepas de *Salmonella* con resistencia a cefoxitina mostraron portar el gen *CMY-2*. Los patrones de electroforesis de campos pulsados fueron distintos en todos los aislados, lo cual indica que no existe una relación clonal entre ellos.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran la presencia de la β -lactamasa CMY-2 entre las cepas de *Salmonella* aisladas en nuestra comunidad, por lo cual, es necesario implementar en los laboratorios de microbiología clínica, métodos estandarizados para la búsqueda rutinaria de β -lactamasas AmpC en los aislados bacterianos.

Objetivos

Objetivo General

Identificación molecular de cepas de *Salmonella enterica* no-Typhi productoras de β -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos.

Objetivos Particulares

- Determinar los patrones de susceptibilidad a agentes antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de heces en un hospital de tercer nivel durante 2002 a 2007.
- Demostrar la presencia de genes *ampC* mediante los ensayos fenotípicos de 3^a dimensión, y por potenciación y sinergismo usando ácido borónico.
- Confirmar la presencia del gen responsable de la enzima β -lactamasa tipo AmpC en los aislados clínicos por PCRm.
- Determinar si existe relación clonal entre los aislados clínicos por electroforesis de campos pulsados.

Antecedentes

3.1 Familia Enterobacteriaceae

La familia de bacterias de mayor importancia en medicina humana es la Enterobacteriaceae. Los miembros de esta familia son bacilos cortos Gram negativos con bordes redondeados, sin agrupación, que miden de 0.5 a 1.5 μm de ancho y 2-4 μm de largo, anaerobios facultativos, no esporulados, móviles por flagelos peritricos o inmóviles, y algunos presentan cápsula. En cuanto a sus requerimientos nutricionales estas bacterias no son exigentes, por lo que pueden crecer en medios mínimos esenciales y muestran resistencia a varias sustancias químicas como sales biliares y cristal violeta.

Esta familia incluye géneros y especies que causan enfermedades con síntomas clínicos como diarrea, fiebre tifoidea y disentería. Así como oportunistas que causan infecciones nosocomiales como neumonía, sepsis e infecciones del tracto urinario.²

3.2 Género *Salmonella*

3.2.1 Microbiología y clasificación

Salmonella es un género de la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram Negativo que se comporta como patógeno intracelular facultativo. Estas cepas son fermentadoras de glucosa con producción de ácido y gas, reducen nitratos y no producen citocromo oxidasa. La mayoría de estos organismos son móviles y no fermentan la lactosa.^{8,24}

El aislamiento de *Salmonella* de especímenes fecales se puede realizar en medios de cultivo como agar MacConkey (MC), *Salmonella-Shigella* (SS) y Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD); también pueden utilizarse medios selectivos como el agar verde brillante y sulfito de bismuto. Cuando se requiere enriquecer el aislamiento se emplean medios como el caldo tetrionato o selenito de sodio.^{2,24}

Según el esquema de clasificación actual del Centro de Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas (CDC) de Estados Unidos, el género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*. Esta última se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Las cepas de *S. enterica* subespecie *enterica* son usualmente aisladas de humanos y animales de sangre caliente, como *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*), *S. Enteritidis*, *S. Newport* y *S. Agona*. Las subespecies como *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* y *S. bongori* son aisladas usualmente de animales de sangre fría y del medio ambiente.²

Para designar la fórmula antigénica de los serotipos, se realizan reacciones de los cultivos con anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie de la bacteria, los cuales son: antígeno O (somático), antígeno H (flagelar) de fase 1 y antígeno H de fase 2 (si está presente). Las fórmulas antigénicas de todos los serotipos reconocidos de *Salmonella*, están listadas en el esquema de Kauffman-White, siendo en la actualidad, más de 2500. El antígeno O corresponde a la porción de lípido A del lipopolisacárido de la pared celular de bacterias Gram negativas, que le confiere una actividad endotóxica importante.^{8, 24}

3.2.2 Manifestaciones clínicas

Los serotipos de *Salmonella* producen manifestaciones clínicas específicas entre las que se encuentran gastroenteritis, fiebre entérica, bacteremia e infección vascular. Sin embargo, también pueden causar infecciones localizadas como osteomielitis o infecciones del tracto urinario.^{2,22,24,27}

3.2.2.1 Gastroenteritis

La gastroenteritis desarrollada por *Salmonella* es indistinguible de la causada por otros patógenos gastrointestinales.²⁷ Los principales serotipos asociados a este síndrome son *S. Typhimurium*, *S. Newport* y *S. Enteritidis*.²⁴ Dependiendo de los factores del hospedero y del tamaño del inóculo, los síntomas se presentan entre 12 a 48 hrs después de la ingestión del patógeno en comida o agua contaminada y usualmente consiste de náuseas, vómito y

diarrea. Los síntomas desaparecen 3 a 7 días, instaurando líquidos y electrolitos. En adultos el microorganismo continúa excretándose en las heces al menos 4 a 6 semanas después de que desaparecen los síntomas, y en niños menores de 5 años pueden excretarse por más de 20 semanas.^{8,24} Los niños menores de 1 año y los adultos mayores de 60 años de edad, son los más vulnerables a este tipo de infecciones y por lo tanto la enfermedad suele ser más severa.^{22,27}

3.2.2.1.1 Patogénesis

Cuando *Salmonella* es ingerida por vía oral, la bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en el ambiente ácido del estómago, donde empieza a colonizar e invadir los compartimentos intracelulares de los fagocitos y las células epiteliales intestinales.¹⁴ La enterotoxina producida por estas cepas, estructuralmente similar a la toxina del cólera, se considera que es el factor de virulencia responsable de la hipersecreción intestinal de líquidos y electrolitos, y la invasión a los enterocitos, produciéndose una respuesta inmune que afecta la función epitelial intestinal.^{8,27} Los genes de virulencia que le permiten adaptarse a cambios ambientales que se le presentan durante el proceso, se encuentran en cinco islas de patogenicidad de su cromosoma.¹⁴

Los serotipos de *S. enterica* asociados con infecciones humanas y de animales, como Enteritidis, Typhimurium, Dublín, Choleraesuis y Pullorum, albergan plásmidos de virulencia de 50 a 100 kilobases, los cuales tiene una región idéntica conocida como región *spv*. Esta región contiene al menos cinco genes, *spvRABCD*, los cuales están involucrados en la sobrevivencia intracelular de *Salmonella*, su multiplicación y diseminación sistémica.^{8,33} La mayoría de los plásmidos de alto peso molecular, mayor a 200 kb, son plásmidos que le confieren a la bacteria resistencia a múltiples antibióticos y se les conoce como plásmidos R.

3.2.2.1.2 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la gastroenteritis se hace mediante la observación clínica de los síntomas, la historia del consumo reciente de alimentos y por cultivo del microorganismo a partir de las heces. Debido a que esta enfermedad es autolimitada, la rehidratación oral con electrolitos y

glucosa es el principal tratamiento para la gastroenteritis, dado que el tratamiento con antibióticos no reduce el curso de la enfermedad o elimina el estado de portador.²⁴

Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, adultos mayores y niños menores de 1 año, que tienden a presentar la enfermedad más severa o en caso de que la infección se disemine desde el intestino a otros órganos, se debe comenzar con la terapia antimicrobiana. Los antibióticos recomendados para aislados susceptibles fueron incluyeron ampicilina, cloranfenicol y trimetoprima-sulfametoxazol. Con el incremento de resistencia a antimicrobianos convencionales, o en casos de salmonelosis severa, las fluoroquinolonas (FQ) y cefalosporinas de espectro extendido (CEE) son el tratamiento de elección.

Las FQ, como ciprofloxacina, son administradas para el tratamiento en adultos y pacientes inmunocomprometidos y en pacientes pediátricos, el tratamiento consiste en la administración de cefalosporinas de espectro extendido, como ceftriaxona. Sin embargo, en las dos décadas pasadas, se ha reportado una situación alarmante del incremento de resistencia a estas dos clases de antimicrobianos, entre los serotipos de *Salmonella* no-Typhi.^{22,37}

3.3 Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana es un problema de un gran número de especies bacterianas de importancia médica que dificulta la erradicación de las infecciones que ellas producen. El consumo indiscriminado de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente favorable para la selección de bacterias que resisten los efectos de estos.

Los microorganismos pueden presentar una resistencia natural o adquirida a una clase de antimicrobianos mediante mecanismos específicos como: la degradación enzimática o modificación del agente antimicrobiano, alteración del blanco del antibiótico y/o decremento en la permeabilidad al agente antimicrobiano.³¹

La resistencia natural de los microorganismos se presenta en todos los miembros de un grupo, género o especie bacteriana. Por ejemplo, la resistencia hacia aztreonam entre

bacterias Gram positivas, la resistencia a vancomicina entre bacilos Gram negativos o la resistencia a antibióticos β -lactámicos en algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae.³¹

Por otra parte, los microorganismos pueden adquirir la resistencia a antimicrobianos debido a una alteración genética mediante mutaciones o transferencia genética. Por ejemplo, se ha reportado que las bacterias Gram negativas intercambian plásmidos R mediante conjugación.³¹

3.3.1 Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos constituyen uno de los grupos de mayor uso en el tratamiento de enfermedades bacterianas. Dentro de estos, se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactamas e inhibidores β -lactámicos. Todos los antibióticos β -lactámicos interfieren en la síntesis de peptidoglucano de la pared celular bacteriana. Después de unirse a las proteínas de unión a penicilina (PBP), inhiben la enzima de transpeptidación que establece puentes cruzados entre las cadenas de peptídicas que están unidas al esqueleto de peptidoglucano. El acontecimiento bactericida final es la inactivación de un inhibidor de enzimas autolíticas de la pared celular, lo que da lugar a la lisis de la bacteria.

3.3.2 Resistencia a antibióticos β -lactámicos

El uso indiscriminado de antibióticos β -lactámicos en medicina humana y veterinaria ha seleccionado inevitablemente bacterias resistentes.²² En bacterias Gram positivas los principales mecanismos de resistencia son la modificación o sustitución de las PBP. En bacterias Gram negativas la resistencia puede deberse a una baja permeabilidad de la membrana externa al antibiótico, con frecuencia debido a mutaciones que reducen la expresión de proteínas específicas llamadas porinas o bien alteraciones en el transporte del antimicrobiano (influjos o eflujos) que reducen la acumulación intracelular del antimicrobiano. Sin embargo, la producción de β -lactamasas, es el principal mecanismo de resistencia antimicrobiana.^{22,31}

3.4 β -lactamasas

Las β -lactamasas son secretadas en el espacio periplásmico de la pared celular de las bacterias Gram negativas.³¹ En algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae la producción de β -lactamasas puede llevarse a cabo de forma intrínseca, o bien de forma adquirida mediada por plásmidos. La clasificación de estas enzimas se realiza en base a sus características moleculares, y los sustratos que hidrolizan (Tabla 1).³

Tabla 1. Clasificación de β -lactamasas de bacterias Gram negativas.¹⁹

Tipo de β -lactamasa	Ejemplos	Sustratos	Inhibición por ácido clavulánico ^a	Clase molecular ^b
Amplio espectro	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Penicilina G, amoxicilina, ampicilina y piperacilina. Cefalosporinas de primera generación.	+++	A
	Familia OXA	Cloxacilina, metilicina, oxacilina y los sustratos anteriores.	+	D
Espectro extendido	Familia TEM y SHV. Otras (PER-1, PER-2, BES-1, TLA-1, VEB-1, VEB-2)	Sustratos del grupo de amplio espectro, cefalosporinas de tercera generación y monobactamas	++++	A
	Familia CTX -M	Sustratos del grupo de espectro extendido y para algunas enzimas, cefepime	++++	A
	Familia OXA	Igual que la familia CTX-M	+	D
AmpC	Familia CMY y FOX, ACC-1, DHA-1, DHA2, LAT, MIR-1, MOX-1, MOX-2	Sustratos del grupo de espectro extendido y cefamicinas	0	C
Carbapenemasas	Familia IMP y VIM	Sustratos del grupo de espectro extendido, cefamicinas y carbapenemes	0	B
	KPC-1, KPC-2, KPC-3		+++	A
	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26.		+	D

^a+, +++, ++++ Denota sensibilidad a la inhibición por ácido clavulánico.

^bLas β -lactamasas pertenecientes a las clases moleculares A, C y D son serina- β -lactamasas, mientras que las de clase B son metalo- β -lactamasas.

Las familias de enzimas TEM, SHV, y CTX-M son las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) diseminadas mayormente en el mundo.¹ Los principales patógenos productores de BLEE son *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter* spp. asociados a infecciones nosocomiales. En México, en 1999, el grupo de investigadores dirigido por Silva³⁴ reportó por primera vez la detección de β -lactamasas en estas enterobacterias, y posteriormente reportó un brote producido por una clona de *K.pneumoniae* productora de las β -lactamasas TEM y SHV en un hospital de Cuernavaca.³⁵

En las infecciones adquiridas en la comunidad por *Salmonella*, se han descrito la producción de β -lactamasas de tipo BLEE y AmpC mediadas por plásmidos.^{1,25} Los primeros reportes de aislados de *Salmonella* productores de BLEE se realizaron a principios de los años 80s en pacientes pediátricos de ciudades de África. La mayoría de esos aislados producían BLEE de los tipos SHV-2, SHV-5, SHV-12 y de los tipos TEM-3, TEM-25, TEM-52. En 1989, la variante CTX-M-2 también fue encontrada en aislados de *Salmonella*, demostrándose que la bacteria ha adquirido otras β -lactamasas mediadas por plásmidos como KPC, PER y OXA.^{1,25}

En el año de 1990 emergió en Gran Bretaña una clona de *Salmonella* serovar Typhimurium DT104 con resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfametoxazol y tetraciclina, (ACSSuT), o también denominado multi-resistente (MR). Esta resistencia es codificada por genes cromosómicos con gran potencial de transferencia horizontal a través de plásmidos que, además, transfieren otros genes de resistencia.²² El fenotipo de MR, en *Salmonella* Typhimurium fue el más frecuente durante dos décadas y además se ha reportado que ha adquirido una resistencia adicional a trimetoprima-sulfametoxazol, kanamicina, ácido nalidíxico y/o ciprofloxacino.^{11,13,21,25,37}

El número de antibióticos a los cuales las cepas de éste género son resistentes, continúa incrementándose, ya que en muchos lugares, se han reportado brotes o infecciones producidas por cepas de *Salmonella* resistentes a cefalosporinas de espectro extendido (R-CEE).^{11,13} La emergencia de cepas MR de *Salmonella* Typhimurium y Newport, productoras de β -lactamasas AmpC (MR-AmpC), representan una nueva problemática mundial.²² Las infecciones causadas por *S. Typhimurium* y *S. Newport* MR-AmpC se han

asociado al consumo de productos de origen animal como carne de vaca y caballo, contaminada con estas cepas.^{29,47}

La resistencia a FQ no es común en *Salmonella*. En algunas ciudades de Asia y Europa se han reportado aislados resistentes a ciprofloxacino (0.5%) en serovares invasivos como Choleraesuis, Virchow, Dublín, Heidelberg y Typhimurium. Sin embargo, la resistencia a ácido nalidíxico asociada con susceptibilidad reducida a fluoroquinolonas (SR-FQ) se presentó en un porcentaje mayor (14%) de los aislados, lo que se ha relacionado con fallas en el tratamiento después de la administración de FQ a pacientes con salmonelosis invasiva.^{18,22}

3.4.1 β -lactamasas AmpC

Las β -lactamasas AmpC son cefalosporinasas que confieren resistencia a una amplia variedad de antimicrobianos β -lactámicos como oximiinocefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima y cefpodoxima), cefamicinas (cefexitina) y monobactamas (aztreonam), y son inhibidas pobremente por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.³⁹

El gen *ampC*, que codifica la expresión de β -lactamasas AmpC, está localizado en el cromosoma de algunas especies bacterianas de la familia Enterobacteriaceae como *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Hafnia alvei*, y bacterias Gram negativas no entéricas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, y *Acinetobacter baumannii*. Estos genes han sido movilizados e integrados en plásmidos transferibles a bacterias como *Salmonella*, *K. pneumoniae* y *Proteus vulgaris*, lo cual contribuye a la transferencia horizontal de la resistencia a antimicrobianos.^{28,39}

En base a la homología en su secuencia de aminoácidos, las β -lactamasas mediadas por plásmidos se han dividido en 5 familias.^{28,39} La más grande y mayormente diseminada es la familia CMY, la cual se cree que se ha originado de la β -lactamasa cromosomal AmpC de *C. freundii*. El análisis del entorno genético del gen cromosómico *bla_{CMY}* de *C. freundii*

muestra que éste es seguido por los genes *blc* y *sugE*, y su expresión es regulada por el gen *ampR*.^{15,22}

En *Salmonella*, los plásmidos que poseen el gen *bla_{CMY}* tienen un alto grado de identidad con los genes encontrados en la misma región del gen *ampC* del cromosoma de *C. freundii*; sin embargo, la expresión del gen *ampC* es constitutiva debido a que el gen *ampR* no es transferido en el plásmido. En su lugar, se ha encontrado un elemento de inserción *ISEcp1*, el cual podría estar involucrado en la captura del gen *ampC*.^{29,38} Estos elementos de inserción modulan los niveles de resistencia por alteración en el promotor que resulta en una activación transcripcional más eficiente del gen de resistencia.⁹

3.4.1.1 Detección fenotípica

Los métodos de identificación de la producción de β -lactamasas de espectro extendido en algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae ya han sido establecidos y aplicados clínicamente de acuerdo a los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).⁵ No obstante, para las β -lactamasas del tipo AmpC plasmídicas no hay recomendaciones de ensayos fenotípicos por la CLSI;¹⁰ sin embargo, se han reportado recientemente algunos ensayos en 3^a dimensión (3D)⁶ y ensayos de potenciación y sinergismo con inhibidores β -lactámicos con una alta sensibilidad y especificidad.^{7,43}

3.4.1.1.1 Ensayos en 3D usando extractos bacterianos

Este ensayo fue el primer método fenotípico descrito para la identificación de β -lactamasas AmpC. Consiste en un ensayo modificado de difusión en disco, en el que se hace una incisión en el agar a una distancia del disco, en la cual se inocula la cepa en estudio. Posterior a 24 hrs de incubación, la inactivación enzimática del antimicrobiano es detectada en el margen de la zona de inhibición justamente en la intersección de la incisión inoculada. La distorsión de la zona de inhibición, que comúnmente es circular, indica la inactivación del antimicrobiano, lo cual ocurre como resultado de la difusión de la enzima en el agar hacia su sustrato.⁶

3.4.1.1.2 Ensayos de sinergismo y potenciación

Los compuestos de ácido borónico tienen efectos inhibitorios contra las β -lactamasas clase C.¹⁰ El ácido 3-aminofenilborónico (AFB), un derivado del ácido borónico, es un compuesto ampliamente utilizado en ensayos de difusión en disco para comparar la actividad de estas enzimas en ausencia y presencia de este inhibidor.^{7,43} Este compuesto aún no ha sido utilizado con fines terapéuticos y su uso se limita únicamente a la detección de enzimas AmpC en el laboratorio.

3.4.1.2 Detección genotípica

La identificación genotípica de las β -lactamasas clase C puede realizarse utilizando el ensayo de PCR múltiple (PCRm) publicado por Pérez-Pérez *et al.*,²⁶ el cual identifica el gen *ampC* específico de la familia (FOX, EBC, ACC, DHA, CIT y MOX) que es responsable de la expresión de la β -lactamasa AmpC codificada por plásmido, permitiéndonos diferenciarla de las β -lactamasas cromosomales.

Metodología Experimental

4.1 Cepas bacterianas

En este estudio se incluyeron 52 cepas de *Salmonella* aisladas de un total de 6209 especímenes fecales de pacientes con algún padecimiento gastrointestinal, a los cuales se les solicitó un coprocultivo durante enero del 2002 a diciembre del 2007 y que fueron analizados en el Laboratorio de Bacteriología en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) para la búsqueda rutinaria de patógenos bacterianos entéricos, como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

Las cepas de *Salmonella* fueron aisladas en los medios de SS y XLD. Su identificación se realizó por pruebas bioquímicas convencionales² y con las tarjetas de identificación de bacterias Gram negativas usando el sistema semiautomatizado Vitek Jr 60 (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia). Las cepas fueron confirmadas con antisueros de *Salmonella* polivalentes A-I & Vi Difco (Becton Dickinson, MD, E.U.), serotipificadas por el sistema SERIUNAM en la Facultad de Medicina de la UNAM y conservadas a -20°C en caldo infusión-cerebro-corazón conteniendo 15 % de glicerol.

4.2 Pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados se realizaron por el método de difusión en disco y de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con el Sistema Vitek Jr. 60 y la prueba E. La metodología e interpretación de los resultados de estos ensayos se realizó en base a los lineamientos del CLSI.⁵

4.2.1 Método de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en disco

A partir de un cultivo puro en agar MC incubado por 24 hrs a 37°C, se preparó una suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 0.5 de Mac Farland (MF) en 1.8 ml de solución salina al 0.85%. Con un hisopo se realizó la siembra masiva de la suspensión

sobre una placa de agar Mueller-Hinton (MH), se colocaron diferentes sensidiscos (Becton Dickinson, MD, EU) de los agentes antimicrobianos probados y se incubó durante 24 hrs a 37°C. Posteriormente, se registró e interpretó la lectura de los halos de inhibición alrededor del disco.

Los agentes antimicrobianos que se probaron por este método fueron los siguientes: cefpodoxima, (CPD, 10 µg), estreptomina (STP, 10 µg), kanamicina (KAN, 30 µg) y sulfonamida (SUL, 300 µg).

4.2.2 Método de CMI por el Sistema Vitek Jr. 60

Con este método se determina la susceptibilidad antimicrobiana de bacilos Gram negativos. Consta de la tarjeta GNI, con la que se identifica el microorganismo, y las tarjetas GNS-122 y GNS-127 que tienen una serie de diluciones de agentes antimicrobianos.

A partir de un cultivo en agar MC incubado por 24 hrs a 37°C, se preparó una suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 1.0 de MF en 1.8 ml de solución salina al 0.45% con la que se inoculó la tarjeta GNI. Posteriormente se tomaron 50 µl de la suspensión y se pasaron a un tubo que contenía 1.8 ml de solución salina al 0.45%, este procedimiento se realizó por duplicado para inocular las tarjetas GNS-122 y GNS-127. Finalmente, las tarjetas fueron llenadas al vacío, selladas e introducidas en el Sistema Vitek Jr. 60 e incubadas por 24 hrs para obtener el reporte de los resultados.

Los agentes antimicrobianos considerados para la determinación del perfil de susceptibilidad por este sistema fueron: ácido nalidíxico, NAL; amoxicilina/clavulanato, ACA; ampicilina, AMP; aztreonam, AZT; cefalotina, CEF; cefepima, CPM; cefotaxima, CTX; cefotetan, CTT; ceftazidima, CAZ; ceftriaxona, CRO; cloranfenicol, CHL; gentamicina, GEN; imipenem, IMP; tetraciclina, TET y trimetoprima-sulfametoxazol, SXT.

4.2.3 Determinación de la CMI por prueba E

A partir de un cultivo puro en agar MC incubado por 24 hrs a 37°C, se preparó una suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 0.5 de MF en 1.8 ml de solución salina al 0.85%. Con un hisopo se realizó la siembra masiva de la suspensión sobre una placa de agar MH, se colocó la tira E de ciprofloxacino (AB Biodisk, MD, EU) y la placa se incubó durante 24 hrs a 37°C. La lectura de la CMI en la tira E se realizó donde la elipse de inhibición formada interseca la tira.

4.3 Identificación fenotípica de β -lactamasas AmpC

4.3.1 Ensayo en 3D con extracto bacteriano

De una suspensión bacteriana equivalente a 0.5 de MF se tomaron 50 μ l y se agregaron a 12 ml de caldo de Soya Trypticaseína (ST), incubándose por 4 hrs a 37°C. Al término de este tiempo el crecimiento celular se concentró por centrifugación, desechándose la mayor cantidad del sobrenadante hasta que el paquete celular se resuspendiera en aproximadamente 1 ml de ST. Posteriormente, las células fueron lisadas por 5 ciclos de congelación–descongelación, para permitir la liberación de la enzima β -lactamasa.

Sobre la superficie de una placa de agar MH, con un hisopo se realizó la siembra masiva de un extendido de una suspensión de *E. coli* ATCC 25922, cepa susceptible a FOX, ajustada a 0.5 de MF en 1.8 ml de solución salina al 0.85%, y se colocó sobre el agar un disco de 30 μ g de FOX; con un bisturí estéril se realizó una hendidura en el agar a una distancia de 5 mm del disco en dirección radial hacia fuera y se colocaron en ella 30 μ l del lisado celular, el medio se incubó por 24 hrs a 37°C. La distorsión del halo de inhibición justamente en la intersección de la incisión inoculada, se interpretó como un resultado positivo.

4.3.2 Ensayos de sinergismo y potenciación con AFB

4.3.2.1 Antibióticos y AFB

Para realizar estos ensayos se utilizaron discos con 30 µg de FOX, CTT, CTX y CAZ, y discos sin antibiótico. Se prepararon además discos que contenían una concentración final de 300 µl de ácido de AFB, disolviendo 120 µg de AFB en 6 ml de agua destilada estéril, 20 µl de esta solución se agregaron a los discos de FOX, CTT, CTX, CAZ y a discos blancos sin antibiótico; una vez secos, los discos se guardaron en viales protegidos de la luz y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.3.2.2 Cepas

A partir de un cultivo de 24 hrs a 37°C en agar MC de cada cepa a probar, se preparó una suspensión ajustada a 0.5 de MF en 1.8 ml de solución salina al 0.85% y se distribuyó uniformemente con un hisopo sobre placas de agar MH.

4.3.2.3 Ensayo de sinergismo

En el centro de la placa inoculada se colocó un disco sin antibiótico con AFB y a una distancia de 18 mm se colocaron los discos con antibiótico.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 hrs y se observó la forma de los halos de inhibición. La deformación del halo de inhibición de crecimiento alrededor de los discos de FOX, CTT, CAZ y CTX hacia el disco con AFB es indicativa de la producción de una enzima β-lactamasa clase C.

4.3.2.4 Ensayo de potenciación

En este caso, los discos se colocaron en pares, en un extremo el disco sólo con el antibiótico y a una distancia de 30 mm, el disco conteniendo el antibiótico más el AFB.

Las placas se incubaron durante 24 hrs a 37°C y se compararon los diámetros de las zonas de inhibición alrededor de los discos. El fenómeno de potenciación se observa si aumenta el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento (mayor o igual a 5 mm) alrededor de los discos de FOX, CTT, CAZ y CTX en combinación con AFB.

4.4 Identificación genotípica de β -lactamasas AmpC por PCRm

4.4.1 Extracción del ADN bacteriano

A partir de un cultivo de 24 hrs a 37°C en agar ST, una cuarta parte de una colonia se suspendió en 150 μ l de una solución de Chelex al 7.5% (BioRad Chelex 100 Resin), la cual es una resina que nos permite obtener el ADN puro mediante la repulsión de cargas entre ésta y el ADN bacteriano, ya que ambos presentan la misma carga negativa. Esta preparación se colocó en un termociclador (Perkin Elmer, DNA Thermal Cycler), donde las células fueron lisadas por calentamiento a 100°C durante 10 min. La suspensión fue centrifugada a 12,000 rpm durante 10 min para precipitar la resina unida a los componentes bacterianos no deseados. Del sobrenadante se tomaron 2 μ l del ADN bacteriano para la amplificación.

4.4.2 Ensayo de PCRm

La amplificación de los genes *ampC* se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Pérez-Pérez *et al.*²⁶ Los iniciadores usados para la amplificación de PCR se enlistan en la tabla 2. La mezcla de PCR contenía: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCl; 0.5 mM de dNTPs; 1.5 mM MgCl₂; 0.6 μ M de los iniciadores MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR, DHAMF y DHAMR; 0.5 μ M de los iniciadores ACCMF, ACCMR, EBCMF, EBCMR; 0.4 μ M de los iniciadores FOXMF y FOXMR; y 1.25 U de Taq AmpliTaq ADN polimerasa. 2 μ l del ADN extraído se adicionó a 48 μ l de la mezcla de PCR y se agregaron unas gotas de aceite mineral.

El programa de PCR consistió de un paso inicial de desnaturalización a 94°C de 3 min, seguido por 25 ciclos de desnaturalización del ADN a 94°C por 30 seg, alineación a 64°C por

30 seg, y un paso final de extensión a 72°C por 1 min. Después del último ciclo, se agregó un paso final de extensión a 72°C durante 7 min. Alícuotas de 10 µl del producto de PCR se analizaron por electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5x con 2.5 µl de bromuro de etidio, corriéndose a 70 V durante 1.5 hrs.

Controles: como control positivo se utilizó una cepa de *C. freundii* ATCC 8090, y como control negativo una cepa de *E. coli* ATCC 25922.

TABLA 2. Secuencia de los iniciadores usados para amplificación de los genes *ampC*.

Iniciador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño del fragmento amplificado (pares de bases)
MOXMF	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520
MOXMR	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	
CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462
CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	
DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405
DHAMR	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	
ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346
ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	
EBCMF	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302
EBCMR	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	
FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190
FOXMR	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	

4.4.3 Secuenciación del producto de PCR

Para el proceso de secuenciación, el producto de PCR fue purificado usando el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Indianápolis, USA). La secuenciación del ADN se realizó con el programa de Autoanalysis and Sequencing Analysis en el equipo Genetic

Analyzer 3130X (Applied Biosystems, Hitachi). Las secuencias de ADN fueron examinadas con la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>).

4.6 Electroforesis de campos pulsados

Una vez confirmada la presencia de los genes *ampC*, 9 de 10 de los aislados positivos de *Salmonella* fueron comparados por electroforesis de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) para determinar su relación genética, mediante la comparación de los fragmentos de ADN obtenidos por el corte con la enzima de restricción *XbaI*. La PFGE fue desarrollada de acuerdo al protocolo estándar diseñado por el CDC de Estados Unidos,³⁰ como sigue:

1. *Preparación de la suspensión celular*: a partir de un cultivo de la cepa en agar ST incubado 18 hrs a 37°C, se preparó una suspensión bacteriana con una concentración de 15% de transmitancia en amortiguador de suspensión celular (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0).
2. *Preparación de los bloques de agarosa*: a 200 µl de la suspensión bacteriana se agregaron 10 µl de Proteinasa K (20mg/ml) y 200 µl de agarosa al 1%:SDS al 1%; se homogenizó, se dispensó por las paredes de los moldes y se les dejó solidificar en refrigeración por 10 min.
3. *Lisis celular*: los bloques de agarosa se desmoldearon y sumergieron en la solución de lisis celular con 0.1mg/ml de Proteinasa K, 50 mM Tris:50 mM EDTA pH 8.0, 1% Sarcosil, durante 2 hrs a 54°C.
4. *Lavado de los bloques de agarosa*: se removió la solución de lisis en la cual se sumergieron los bloques; los primeros dos lavados consistieron en agregar 1 ml de agua estéril precalentada e incubarlos a 50°C durante 15 min y posteriormente agregar 1 ml de amortiguador TE (10mM Tris:1Mm EDTA, pH 8.0) precalentado e incubar a 50°C durante 15 min tres veces más.

5. *Paso de pre-restricción*: el bloque se removió del amortiguador TE y se transfirió a un nuevo tubo con 200 µl de amortiguador H 10x, diluido 1:10 con agua desionizada estéril, se incubó a 37°C durante 10 min y después se removió el amortiguador H.

6. *Paso de restricción (corte enzimático)*: a los bloques se les agregó 200 µl de la solución enzimática que contenía: 175 µl de agua desionizada estéril, 20 µl de amortiguador H 10x, y 5 µl de la enzima de restricción *Xba*I (10 U/µl, Promega Corp., Madison, WI) y se incubaron durante 2 hrs a 37°C.

Los fragmentos digeridos fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en 0.5x de amortiguador TBE, usando el equipo CHEF-DR II (Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields, Laboratorio BioRad) corriéndose a 6V con una rampa lineal de 2.2 a 54.2 seg durante 19 hrs. El gel se mantuvo a una temperatura de 14°C durante la corrida y se tiñó con bromuro de etidio. Los patrones electroforéticos de bandas fueron analizados con el programa GelCompar II versión 3.0 (Applied Maths, Inc., Austin, TX) y comparados con el coeficiente Dice con 1% de tolerancia.

Resultados

5.1 Cepas bacterianas

Se identificaron 24 distintos serotipos en las 52 cepas de *Salmonella* de los cuales los más frecuentes fueron: 10 *S. Typhimurium* (19.2%), 10 *S. Enteritidis* (19.2%), 5 *S. Agona* (9.6%) y 3 *S. Newport* (5.8%), mientras que el restante 46.2% correspondió a 20 serotipos menos comunes.

5.2 Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana

Como se muestra en la Tabla 3, los antibióticos a los cuales los aislados de diversos serotipos de *Salmonella* mostraron mayor resistencia fueron: tetraciclina (75%), estreptomina (65.4%), sulfonamida (42.3%) y en menor porcentaje a cloranfenicol (34.6%) y ampicilina (25%). Todos los aislados fueron susceptibles a cefotetan, cefepima e imipenem. La R-CEE y a cefoxitina fue del 19.2%, observándose a partir de 2003 y persistió en los años 2004, 2005 y 2007.

El 50% de los aislados de *S. Typhimurium* y los tres aislados de *S. Newport* fueron R-CEE, así como los aislados únicos de *S. Tumodi* y *S. Reading*. Ninguno de los aislados pertenecientes a los serotipos *Enteritidis* y *Agona* fueron R-CEE. El fenotipo de R-CEE de los 10 aislados nos permitió identificar la producción de β -lactamasas de tipo AmpC.

Capítulo V. Resultados

Tabla 3. Susceptibilidad antimicrobiana en las 52 cepas de *Salmonella* aisladas de especímenes fecales en la Ciudad de México, 2002 a 2007.

Agente antimicrobiano	Punto de corte (µg/ml)	Año de aislamiento, No. Aislados resistentes (%)						Total
		2002 n= 8	2003 n= 15	2004 n= 9	2005 n= 4	2006 n= 3	2007 n= 14	
Cloranfenicol	>=32	1(25)	6(40)	3(37.5)	1(25)	1(33.3)	6(42.9)	18(34.6)
Tetraciclina	>=16	6(75)	10(66.7)	7(87.5)	3(75)	3(100)	13(92.9)	39(75)
Trimetroprima-sulfametoxazol	>=4/76	0	2(13.3)	1(12.5)	1(25)	2(66.7)	4(28.6)	10(19.2)
Kanamicina	<=13	0	0	1(12.5)	0	0	0	1(1.9)
Estreptomicina	<=11	6(75)	9(60)	6(75)	3 (75)	2(66.7)	8(57.1)	34(65.4)
Gentamicina	>=16	0	3(20)	1(12.5)	1(25)	2(66.7)	1(7.1)	8(15.4)
Penicilinas								
Amoxicilina/clavulanato	>=32	1(12.5)	5(33.3)	4(50)	1(25)	1(33.3)	6(42.9)	18(34.6)
Ampicilina	>=32	1(12.5)	3(33.3)	2(25)	1(25)	2(66.7)	4(25.6)	13(25)
Monobactamas								
Aztreonam	>=32	0	1(6.7)	0	0	0	0	1(1.9)
Carbapenemes								
Imipenem	>=16	0	0	0	0	0	0	0(0,0)
Cefalosporinas								
1a. Gen Cefalotina	>=32	0	4(26.7)	2(25)	1(25)	0	3(21.4)	10(19.2)
2a. Gen Cefotetan	>=64	0	0	0	0	0	0(0,0)	0(0,0)
Cefoxitina	>=32	0	4(26,7)	2(25)	1(25)	0	3(21.4)	10(19.2)
3a. Gen Ceftazidima	>=32	0	4(26,7)	2(25)	1(25)	0	3(21.4)	10(19.2)
Ceftriaxona	>=64	0	3(20)	1(12.5)	0	0	3(21.4)	7(13.2)
Cepodoxima	>=32	0	4(26,7)	2(25)	1(25)	0	3(21.4)	10(19.2)
Cefotaxima	>=64	0	2(13.3)	0	1(25)	0	1(7.1)	4(7.7)
4a. Gen Cefepima	>=32	0	0	0	0	0	0	0(0,0)

En la Tabla 4 se muestran los perfiles de multi-resistencia que prevalecieron durante el estudio. Del total de 52 aislados de *Salmonella*, 7.7% presentaron susceptibilidad total al panel de agentes antimicrobianos probados en contraste con el 25 % de los aislados que presentaron resistencia debido a uno o dos antimicrobianos entre los que se encontraron: estreptomicina, sulfonamida y tetraciclina. El 13.4% de los aislados de *Salmonella* presentó además resistencia a ampicilina, cloranfenicol o trimetoprima-sulfametoxazol. Los aislados que presentaron resistencia igual o mayor de 8 antimicrobianos, presentaron resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida, tetraciclina, amoxicilina/clavulanato, cefoxitina, y cefpodoxima. Este fenotipo de resistencia denominado MR-AmpC se observó en el 19.2% de los aislados.

Tabla 4. Perfiles de multi-resistencia a antimicrobianos entre cepas de *Salmonella* spp. aisladas en el periodo 2002 a 2007

Antimicrobianos	Aislados resistentes (%)
Ninguno	4 (7,7)
1	13 (25)
2	13 (25)
3	5 (9,6)
>= 4	7 (13,4) ^a
>= 8	10 (19,2) ^b

^a Del total de 7 aislados, 5 presentaron susceptibilidad intermedia a amoxicilina-clavulanato

^b Cepas con el perfil de resistencia MR-AmpC: ACSSuT, a CEE y a cefoxitina.

Algunos de los aislados con fenotipo de resistencia MR-AmpC presentaron además resistencia a gentamicina (60%) y trimetoprima-sulfametoxazol (50%), kanamicina (30.0%) y aztreonam (10%). Adicionalmente, 5 (50%) de estos aislados presentaron SR-FQ, es decir, resistencia a ácido nalidíxico y el valor de la CMI entre 0.125 a 1 µg/ml a ciprofloxacina. En la Tabla 2 se muestra la comparación de los patrones de resistencia.

En la Tabla 5 se muestran los valores de CMI de los antibióticos probados para los 10 aislados con fenotipo de resistencia MR-AmpC.

Capítulo V. Resultados

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de diferentes antibióticos, incluyendo β -lactámicos y quinolonas, en los aislados de *Salmonella* productores de β -lactamasas CMY-2.

ID	Serotipo	Origen ^c	Año	Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a																			
				AMP	CHL	GEN	KAN	STR	SXT	TET	ACA	CEF	FOX	CTT	CTX	CAZ	CRO	CPD	CPM	AZT	NAL ^b	CIP ^b	IMP
6559	S. Newport	H	2003	256	>256	128	S	R	<10	128	>32	>256	>256	<16	256	256	256	R	<4	48	4	0.012	<4
6590	S. Newport	H	2003	>256	>256	4	S	R	<10	256	>32	>256	256	<16	32	64	64	R	<4	6	128	0,19	<4
6851	S. Typhimurium	A	2003	256	>256	256	S	R	>320	128	>32	>256	128	<16	32	256	32	R	<4	4	>256	0,125	<4
6864	S. Tumodi	A	2003	>256	>256	256	S	R	<10	256	>32	>256	>256	<16	64	128	64	R	<4	6	>256	0,19	<4
7600	S. Reading	H	2004	256	256	0.5	R	R	<10	128	>32	>256	>256	<16	32	128	64	R	<4	16	4	0,023	<4
8379	S. Typhimurium	A	2004	256	256	128	S	R	>320	128	>32	>256	256	<16	16	64	32	R	<4	6	>256	0,19	<4
8820	S. Typhimurium	A	2005	>256	>256	128	S	R	>320	128	>32	>256	48	<16	16	32	64	R	<4	4	16	0.047	<4
10790	S. Typhimurium	A	2007	>256	>256	8	S	R	>320	256	>32	>256	128	<16	32	128	64	R	<4	4	16	0,064	<4
10877	S. Typhimurium	A	2007	256	>256	128	R	R	>320	128	>32	>256	256	<16	64	128	64	R	<4	8	128	0,125	<4
61	S. Newport	A	2007	256	256	1	R	R	<10	128	>32	>256	256	<16	32	128	64	R	<4	16	8	0,012	<4

^a Antibióticos determinados por microdilución en caldo: AMP, Ampicilina; CHL, cloranfenicol; GEN, gentamicina; SXT, trimetoprima-sulfametoxazol; TET, tetraciclina; ACA, amoxicilina-clavulanato; CEF, cefalotina; FOX, ceftioxitina; CTT, cefotetan; CRO, ceftriaxona; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; CPM, cefepime; AZT, aztreonam; NAL, ácido nalidixico e IMP, imipenem. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por Kirby-Bauer (concentración del sensidisco) para: KAN, kanamicina (30 μg); STR, estreptomina (10 μg); CPD, cefpodoxima (10 μg). S, sensible; R, resistente. Prueba E sólo se llevo a cabo para: CIP, ciprofloxacino

^b Determinación de susceptibilidad reducida a fluoroquinolonas: NAL, resistente y CIP (0.125 a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

^c Origen del aislado: A, paciente ambulatorio; H, paciente hospitalizado.

5.3 Identificación fenotípica de β -lactamasas AmpC

Los ensayos de tercera dimensión, potenciación y sinergismo con AFB se realizaron en las cepas que mostraron el fenotipo de resistencia a FOX. Las 10 cepas de *Salmonella* que presentaron esta característica dieron reacciones positivas para estos ensayos.

En la figura 1 se muestra el ensayo de tercera dimensión. La flecha indica la distorsión en la zona de inhibición de un resultado positivo para las cepas de *Salmonella* 7600, 6590 y 8379. El control negativo fue la cepa *E. coli* ATTC 25922.

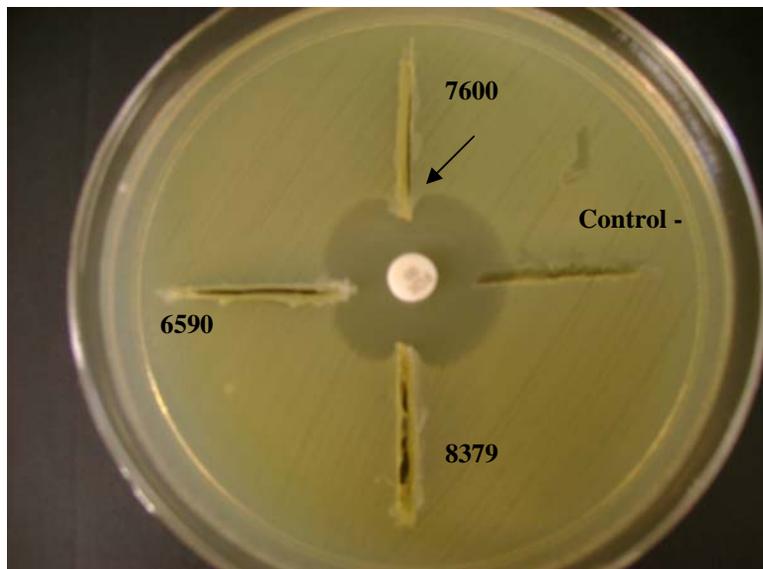


Fig. 1 Ensayo en tercera dimensión.

En la figura 2 se muestra la prueba de potenciación para *Salmonella* 7600. Se observa el aumento del halo de inhibición en el disco de FOX y CTT más AFB indicando la presencia de una cepa productora de AmpC.



Fig. 2 Ensayo de potenciación con AFB

En la figura 3 se muestra la prueba de sinergismo para *Salmonella* 7600. Se observa un alargamiento del halo en los sensidiscos de CTX, CAZ y CTT hacia el disco con 300 µg de AFB, excepto para FOX, debido a la inexistencia de un halo de inhibición dada por la resistencia total a esta cefalosporina.

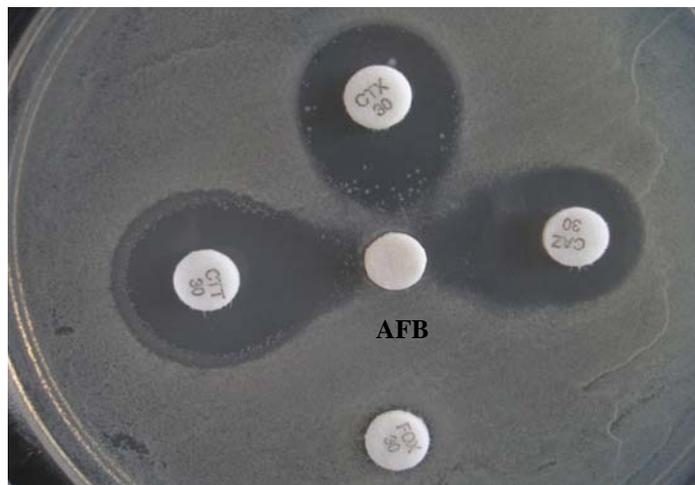


Fig. 3 Ensayo de sinergismo con AFB

5.4 Identificación genotípica de β -lactamasas AmpC por PCRm

En los ensayos de PCRm, en todas las cepas de *Salmonella* R-CEE se amplificó un fragmento de 462 pb que corresponde a la familia CIT de las β -lactamasas clase C mediadas por plásmido. En la Figura 4 se observa el producto de PCR de 9 de las cepas con R-CEE.

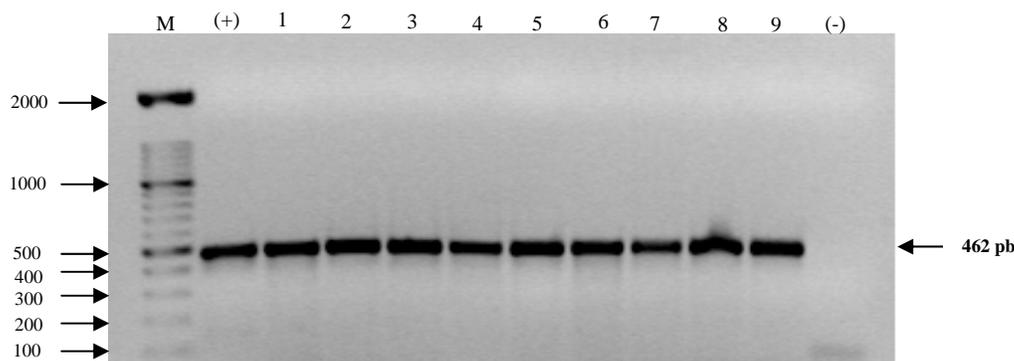


Figura 4. Productos de PCR múltiple separados en gel de agarosa al 1%. M: marcador XIV (Roche Diagnostics) de 100 pb; (+), control positivo, CIT, gen cromosomal *ampC* de *C. freundii* ATCC 8090; carril 1, *S. Newport* 6559; carril 2, *S. Typhimurium* 6851; carril 3, *S. Newport* 6590; carril 4, *S. Tumodi* 6864; carril 5, *S. Reading* 7600; carril 6, *S. Typhimurium* 8379; carril 7, *S. Typhimurium* 10790; carril 8, *S. Typhimurium* 10877; carril 9, *S. Newport* C61;(-), control negativo, *E. coli* ATCC 25922.

Al someter la secuencia de este fragmento a la base de datos del GenBank se identificó el gen *bla_{CMY-2}* que codifica para la cefalosporinasa CMY-2. El alineamiento mostró una homología del 100% para este gen.

5.5 Electroforesis de campos pulsados

Nueve cepas de *Salmonella* productoras de β -lactamasas AmpC fueron analizadas mediante esta técnica. En la Figura 5 se muestran los patrones electroforéticos de bandas obtenidos de cada cepa, así como la descripción del año de su aislamiento y perfil de multi-resistencia. Se identificaron patrones de PFGE distintos en todos los aislados, lo cual indica que no existe relación clonal entre ellos.

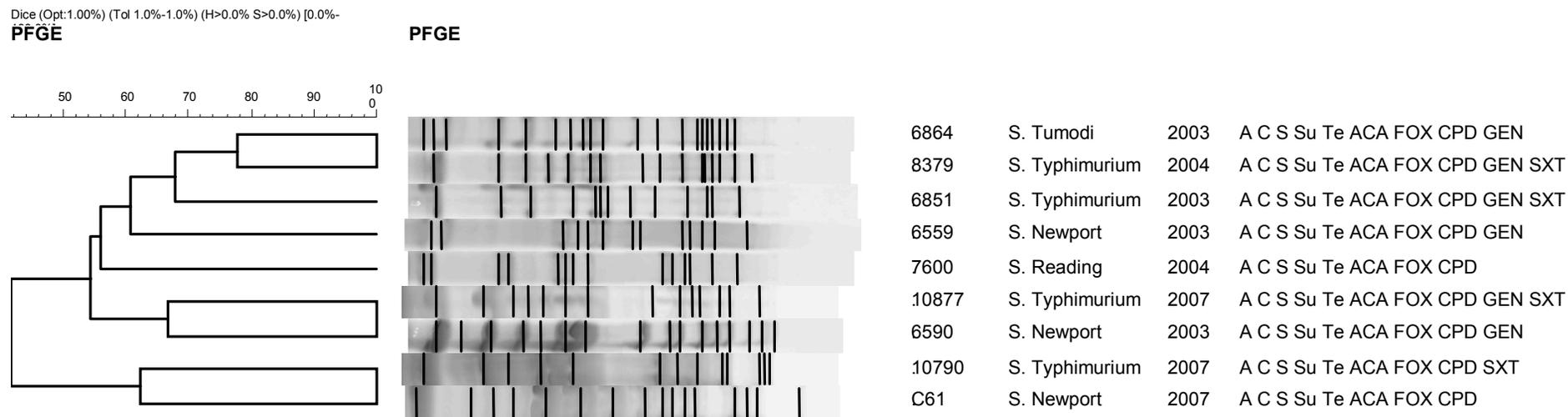


Figura 5. Patrones de PFGE de 9 aislados de *Salmonella* productores de β -lactamasa CMY-2.

Discusión

Los resultados presentados en este estudio demuestran que la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido se debe a la producción de enzimas β -lactamasas CMY-2 en diferentes serotipos de *Salmonella* aislados durante 2002 a 2007 en el INCMNSZ de la Ciudad de México. El 19.2% de todos los aislados de *Salmonella* portaron el gen *bla*_{CMY-2}. Nuestros datos son semejantes a lo publicado por Zaidi *et al*,⁴⁶ quienes en el 2007 realizaron el primer reporte del gen *CMY-2* en México,⁴⁵ y encontraron que el 15.9% de todas las *Salmonellas* spp. aisladas de muestras fecales de niños con diarrea y asintomáticos, en un estudio multicéntrico representando 4 regiones de México de 2002 a 2005, poseen la enzima β -lactamasa CMY-2 mediada por plásmidos. Resulta interesante que estos porcentajes en México son notablemente mayores a los reportados en estudios de vigilancia llevados a cabo en Europa (0.1 a 1%)²³ y Estados Unidos (0.19% a 3.2%),^{40,41} lo cual, nos sugiere que el gen *bla*_{CMY-2} ha tenido una rápida diseminación en los últimos años en nuestro país.

A pesar de que el número de cepas de *Salmonella* (52) aisladas durante este periodo fue pequeño, nuestro trabajo muestra hallazgos interesantes. Encontramos que el 50% de los aislados de *S. Typhimurium*, uno de los serotipos más frecuentes, fueron productores de β -lactamasa tipo AmpC. Este porcentaje es similar al reportado en la Península de Yucatán⁴⁵ que es de 53.8%, una zona en la que el porcentaje de cepas productoras de β -lactamasas AmpC fue superior al de las otras 3 regiones de México, y donde los niños fueron la principal población afectada. Por otro lado, este serotipo, reconocido mundialmente como el de mayor prevalencia, generalmente presenta un perfil de resistencia típico a agentes antimicrobianos de uso común y conocido como ACSSuT o MR. Todos los serovar *Typhimurium* que portan CMY-2 mostraron este patrón de resistencia.

Al igual que *Typhimurium*, el serovar *Newport* ha mostrado MR a agentes antimicrobianos de uso común. La presencia de *S. Newport* MR-AmpC en nuestro medio es preocupante, dado que este serovar ha sido identificado como el agente causal de casos esporádicos¹² y brotes por consumo de tomate.¹⁶ Así mismo, diversos estudios en Estados Unidos,^{29,47} han encontrado que el principal factor de riesgo para adquirir una infección por cepas de

S. Newport multi-resistentes, es el consumo de alimentos de origen animal, principalmente de ganado, contaminados con estas cepas.

Los otros serovares únicos de *Salmonella* que mostraron la presencia de β -lactamasas AmpC fueron Reading y Tumodi, siendo, para nuestro conocimiento, la primera vez que se detecta una enzima del tipo AmpC en este último serovar.

Algunos aislados con el fenotipo MR-AmpC exhibieron multi-resistencia a agentes antimicrobianos incluyendo gentamicina, trimetoprima-sulfametoxazol y kanamicina. Diferentes estudios han reportado que la multi-resistencia antimicrobiana asociada al gen *bla*_{CMY-2}, se debe a la transferencia simultánea de otros determinantes de resistencia cuando el gen *bla*_{CMY-2} es movilizado en los plásmidos.^{17,42,45} Debido a lo anterior, las cepas multi-resistentes, que son más virulentas, pueden producir desde infecciones sistémicas severas hasta la muerte en comparación con cepas susceptibles.²¹

En contraste, los aislados de *S. Enteritidis* (19.2%, 10/52) mostraron susceptibilidad a la gran mayoría de los agentes antimicrobianos incluyendo CEE. La incidencia de β -lactamasas de tipo CMY-2 en este serotipo ha sido reportada como nula.³⁷ Sin embargo, la alta prevalencia en la que se aísla este serotipo debe ser tomada en cuenta ya que se le ha relacionado con un elevado potencial de invasividad.²⁰

Los niños son la población más afectada por la emergencia de cepas productoras de β -lactamasas AmpC que hidrolizan ceftriaxona, una cefalosporina que es de amplio uso en esta población, lo que conlleva al empleo de fluoroquinolonas, alternativas terapéuticas que no son recomendadas para este grupo de edad debido a los posibles efectos adversos que producen. Como lo demuestran nuestros resultados, en los 10 aislados que presentaron R-CEE, el 50% presentaron SR-FQ. Aunque el fenómeno de co-resistencia a CEE y FQ fue considerado raro en la última década,^{18,41} nuestros datos apoyan la emergencia de esta combinación de resistencia entre cepas de *Salmonella* no-Typhi y nos deben motivar a estudiar los factores ligados a la adquisición de esta co-resistencia en especies de *Salmonella*, para evitar así, fallas al tratamiento.

La falta de métodos que detecten β -lactamasas AmpC en los laboratorios de microbiología clínica, es el principal factor que contribuye al desconocimiento de la prevalencia del gen *bla*_{CMY-2} en *Salmonella* en nuestro país. Este estudio muestra que la detección fenotípica puede realizarse empleando el ácido 3-aminofenilborónico con varias CEE en los ensayos de potenciación y sinergismo, como lo han recomendado diversos autores.^{7,43} Estos ensayos, a diferencia del ensayo de tercera dimensión con extractos bacterianos, son fácilmente interpretables y menos laboriosos. Sin embargo, en la detección fenotípica de cefalosporinas AmpC debe considerarse que otras clases de β -lactamasas pueden coexistir en los aislados sin poder ser fácilmente diferenciadas por pruebas fenotípicas, como lo han reportado diversos estudios.^{32,36} Debido a lo anterior, la confirmación fenotípica de β -lactamasas debe realizarse con reserva debido a la importancia que implica para la adecuada elección de la terapia antimicrobiana y el control de la infección.

Nueve de los diez aislados de *Salmonella* AmpC fueron distinguibles por sus patrones de PFGE, demostrando que no representan la diseminación epidémica de una clona, sino la diseminación horizontal de un determinante de resistencia, el cual está presente en plásmidos transferibles.⁴

Debido a la rapidez con la que el gen *bla*_{CMY-2} puede diseminarse en nuestro medio, es necesario establecer métodos estandarizados para la búsqueda rutinaria de β -lactamasas AmpC en los laboratorios clínicos, así como implementar medidas de vigilancia del uso de antibióticos en la comunidad y en instituciones médicas, lo que contribuiría a prevenir y controlar la selección de cepas resistentes.

Conclusiones

- La R-CEE en cepas de *Salmonella* aisladas en nuestro medio se debe a la presencia de la β -lactamasa CMY-2 de tipo AmpC mediada por plásmido, con mayor prevalencia en los serotipos Typhimurium y Newport.
- La resistencia mediada por el gen *bla*_{CMY-2} encontrada en las cepas de *Salmonella* aisladas en nuestro hospital, es superior a la reportada en estudios de vigilancia de Estados Unidos y Europa.
- La presencia de las β -lactamasas CMY-2 en los aislados bacterianos puede detectarse en los laboratorios de microbiología clínica mediante la implementación de ensayos fenotípicos empleando ácido borónico.
- La diseminación del gen de resistencia *bla*_{CMY-2} no se debe a la diseminación de una clona multi-resistente.
- En nuestros aislados se presentó la emergencia de cepas que presentaron R-CEE y SR-FQ, por lo que es importante el estudio de la adquisición de esta co-resistencia.
- La R-CEE y SR-FQ que presentan las cepas de *Salmonella* en nuestro medio reduce la eficacia de dos agentes antimicrobianos ampliamente usados para el tratamiento de la salmonelosis invasiva.

Referencias

1. **Arlet, G., T.J. Barrett, P. Butaye, A. Cloeckaert, M. R. Mulvey, and D. G. White.** 2006. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microb Infect.* **8**:1945-1954.
2. **Bopp, C. A., F. W. Brenner, J. G. Wells and N. Strockbine.** 2003. *Escherichia, Shigella, and Salmonella.* p. 663-667. *En* P. R Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Jorgensen, and R. H. Tenover. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
3. **Bush, K., G.A. Jacoby and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**:1211-1233.
4. **Carattoli, A., F. Tosini, W.P. Giles, M.E. Rupp, S.H. Hinrichs, F.J. Angulo, T.J. Barret and P.D. Fey.** 2002. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:1269-1272.
5. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.
6. **Coudron, P. E., E. S. Moland, and K. S. Thomson.** 2000. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamase among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. *J Clin Microbiol.* **38**:1791-1796.
7. **Coudron, P.E.** 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* **43**:4163-4167.

8. **Cox, J.**, 2000. *Salmonella* p. 1928-1937. En R.K Robinson. Encyclopedia of food microbiology. Academic Press, USA.
9. **Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz and P. Courvalin.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev. **20**:79-114.
10. **Doi, Y., D. L. Paterson.** 2007 Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. I J Infect Dis. **11**:191-197.
11. **Dunne E.F., P.D. Fey, P. Kludt, R. Reporter, F. Mostashari, P. Shillam, J. Wicklund, C. Miller, B. Holland, K. Stamey, T.J. Barrett, J.K. Rasheed, F.C. Tenover , E.M. Ribot , F.J. Angulo.** 2000. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. JAMA. **284**:3151-3156.
12. **Egorova, S., M. Timinouni, M. Demartin, S. A. Granier, J. M. Wichard, V. Sangal, L. Fabre, A. Delauné, M. Pardos, Y. Millemann, E. Espié, M. Achtman, P. A. Grimont and F. Weill.** 2008. Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport. Emerg Infect Dis **14**:954-957.
13. **Fey, P.D., T.J. Safraneck, M.E. Rupp, E.F. Dunne, E. Ribot, P.C. Iwen, P.A. Bradford, F.J. Angulo, S.H. Hinrichs.** 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. N. Eng J. Med. **342**: 1242-1249.
14. **Figuroa, I. M and A. Verdugo.** 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Rev Latin Microbiol. **47**:25-42.
15. **Giles, W.P., A.K. Benson, M.E. Olson, R.W. Hutkins, J.M. Whichard, P.L. Winokur and P.D. Fey.** 2004. DNA sequence analysis of regions surrounding *bla*_{CMY-2} from mutiple *Salmonella* plasmid backbones. Antimicrob Agents Chemother. **48**:2845-2852.

16. **Greene, S.K., E.R. Daly, E.A. Talbot, L.J. Demma, S. Holzbauer, N.J. Patel, T.A. Hill, M.O. Walderhaug, R.M. Hoekstra, M.F. Lynch and J.A. Painter.** 2008. Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields. 2005. *Epidemiol. Infect.* **136**:157-165.
17. **Gupta, A., J. Fontana, C. Crowe, B. Bolstorff, A. Stout, S. Van, M. P. Hoekstra, J. M. Whichard, T. J. Barrett and F. J. Angulo.** 2003. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. *J Infect Dis.* **188**:1707-16.
18. **Hopkins, K.L., R.H. Davies and E.J. Threlfall.** 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *J Antimicrob Agents.* **25**:358-373.
19. **Jacoby, G.A., and L. Muñoz-Price.** 2005. The New β -lactamases. *N Engl J Med.* **352**:380-91.
20. **Jones, T.F., L.A. Ingram, P.R. Cieslak, D.J. Vugia, M. Tobin-D Angelo, S. Hurd, C. Medus, A. Cronquist and F.J. Angulo.** 2008. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis.* **198**:109-14.
21. **Martin, L.J., M. Fyfe, K. Doré, J.A. Buxton, F. Pollari, B. Henry, D. Middleton, R. Ahmed, F. Jamieson, B. Ciebin, S.A. McEwen and J. B. Wilson.** 2004. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. *J. Infect Dis.* **189**: 377-84.
22. **McDermott, P.F.** 2006. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. p. 54-55, 120-132, 296-300 *En Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* ASM Press, Washington, D.C.
23. **Meakins, S., I. Fisher, C. Berghold, P. Gerner-Smidt, H. Tschape, M. Cormican, I. Luzzi, F. Schneider, W. Wannett, J. Coia, A. Echeita and E. J. Threlfall on behalf of**

- Enter-net participants.** 2008. Epidemiology. Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000 – 2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microb Drug Resist.* **14**:31-35.
24. **Miller, S.I., E.L. Hohmann, D.A. Pegues.** 1995. *Salmonella* (Including *Salmonella* Typhi). p. 2013- 2028. *En* G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin. Principles and practice of infectious diseases, 4th ed. Churchill Livingstone, New York, NY.
25. **Miriagou, V., P.T. Tassios, N.J. Legakis and L.S. Tzouvelekis.** 2004. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *I J Antimicrob Agents.* **23**:547-555.
26. **Pérez-Pérez, F.J. and N.D. Hanson.** 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* **40**:2153-2162.
27. **Petri, W.A., M. Miller, H.J. Binder, M.M. Levine, R. Dillingham and R.L. Guerrant.** 2008. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J Clin Inv.* **118**:1277-1290.
28. **Philipoon, A., G. Arlet, G.A. Jacoby.** 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:1-11.
29. **Rankin, S.C., H. Aceto, J. Cassidy, J. Holt, S. Young, B. Love, D. Tewari, D. S. Munro, and C. E. Benson.** 2002. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. *J. Clin Microb.* **40**:4679-4684.
30. **Ribot, E.M., M.A. Fair, R. Gautom, D.N. Cameron, S.B. Hunter, B. Swaminathan, et al.** 2006. Standarization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* **3**:59-67.

31. **Richard Quintiliani, J.R., D.F. Sham and P. Courvalin.**1999. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. p 1505-1510. *En* P. R Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Jorgensen, and R. H. Tenover Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
32. **Robberts, F.J.L., P.C. Kohner, and R. Patel.** 2009. Unreliable extended-spectrum β -lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Clin Microbiol.* **47**:358-361.
33. **Rychlik, I., D. Gregorova, and H. Hradecka.** 2006. Distribution of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol.* **112**:1-10.
34. **Silva, J., C. Aguilar, Z. Becerra, F. López-Antuñano, R. García.** 1999. Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of enterobacteria in Mexico. *Microb Drug Resist.* **5**:189-93.
35. **Silva, J., R. Gatica, C. Aguilar, Z. Becerra, U. Garza-Ramos, M. Velázquez, G. Miranda, B. Leños, F. Solórzano, and G. Echániz.** 2001. Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. *J. Clin Microb.* **39**:3193-3196.
36. **Son, W., I.K. Bae, Y. Lee, S. Lee and S. H. Jeong.** 2007. Detection of extended-spectrum β -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp and *Escherichia coli*. *J. Clin Microbiol.* **45**:1180-1184
37. **Su, L.H., C.H. Chiu, C. Chu and J.T. Ou.** 2004. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin Infect Dis.* **39**: 546-51.
38. **Su, L. H., H. L. Chen, J.H. Chia, S.Y. Liu, C. Chu, T.L. Wu and C.H. Chiu.** 2006. Distribution of a transposon-like element carrying *bla*_{CMY-2} among *Salmonella* and other Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* **57**:424-429.

39. **Walther-Rasmussen, J and N. Helby.** 2002. Plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Can J Microbiol.* **48**:479-493.
40. **Whichard, J. M., K. Joyce, P. D. Fey, J. M. Nelson, F. J. Angulo and T. J. Barrett.** 2005. β -lactam resistance and *Enterobacteriaceae*, United States. *Emerg Infect Dis.* **11**:1464-1466.
41. **Whichard, J.M., K. Gay, J.E. Stevenson, K.J. Joyce, K.L. Cooper, M. Omondi, F. Medalla, G. A. Jacoby, and T.J. Barret.** 2007. Human *Salmonella* and concurrent decreased susceptibility to quinolones and extended-spectrum cephalosporins. *Emerg Infect Dis.* **13**:1681-1688.
42. **Winokur, P.L., A. Brueggemann, D.L. DeSalvo, L. Hoffmann, M.D. Apley, E.K. Uhlenhopp, M.A. Pfaller and G.V. Doern.** 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 2777-2783.
43. **Yagi, T., J. Wachino, H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, and Y. Arakawa.** 2005. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* **43**:2551-2558.
44. **Yan JJ, Ko WC, Chiu CH, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ.** 2003. Emergence of ceftriaxone-resistant *Salmonella* isolates and rapid spread of plasmid-encoded CMY-2 like cephalosporinase, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* **9**:323-328.
45. **Zaidi, M.B., V. León, C. Canche, C. Pérez, S. Zhao, S.K Hubert, J. Abbott, K. Blickenstaff and P.F. McDermott.** 2007. Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla*_{CMY-2} *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *J Antimicrob Chemother.* **60**:398-401.

46. Zaidi, M.B., J.J. Calva, M.T. Estrada-García, V. León, G. Vazquez, G. Figueroa, E. Lopez, J. Contreras, J. Abbott, S. Zhao, P. McDermott and L. Tollefson. 2008. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp in México. *Emerg Infect Dis.* **14**:429-435.

47. Zhao, S., S. Qaiyumi, S. Friedman, R. Sinhg, S.L. Foley, D. G. White, P.F. McDermott, T. Donkar, C. Bolin, S. Munro, E.J. Baron, and R.D. Walker. 2003. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated form humans and food animals. *J Clin Microbiol.* **41**:5366-5371.