



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Identificación de los genes *armA*, *rmtB* y *rmtC* asociados a
resistencia a aminoglucósidos en aislados de *Salmonella*
enterica de origen bovino

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

VÍCTOR ALFONSO VÁZQUEZ ACEITUNO

Asesores

MVZ INDA MARCELA FIGUEROA OCHOA

MVZ RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2018



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.

DEDICATORIAS

A mi madre, la Sra. Clemencia Aceituno Guzmán por toda la paciencia y apoyo que tuvo conmigo en el proceso que llevó esta tesis.

A mi hermano, Jesús Vázquez Aceituno, por ser un buen hombre y ser un ejemplo de profesionalismo.

A mi padre el Sr. Jesús Vázquez Delgado que hace tanto tiempo partió y cuida a su familia desde donde quiera que esté.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por toda la paciencia y las enseñanzas que me ha dado. Además de ser un guía, una persona alegre, un ejemplo de trabajo, tenacidad y un modelo a seguir.

A la Dra. Inda Marcela Figueroa Ochoa por seguirme desde que fui un estudiante de primer semestre hasta ahora. Por apoyarme en momentos difíciles... Por los momentos de trabajo que pasamos juntos.

A la Dra. Erika Margarita Casas Carrillo y la Dra. Margarita Leyva Leyva por impulsarme en todo momento a seguir con esta tesis y no darme por vencido.

A la Dra. Ma. Grisel Anaya Santillán y a todo el personal del Laboratorio de Serología. Por ser un ejemplo de trabajo incansable, tenacidad y apoyarme en todo momento. Muchas gracias a los Sres. María Castillo Hernández y Juan Martínez Cisneros. Espero contar con su amistad por muchos años.

A todo el personal del departamento de Microbiología e Inmunología. En especial a los que formaron parte de mi formación. A la Dra. Laura Cobos Marín, Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dra. Rosa Elena Miranda Morales, Dra. Liliana Valdez Vázquez, Dra. María Antonieta Mojica Sánchez, Dra. María Cristina Rodríguez Sánchez, Dr. Daniel Atilano López y al Dr. José Alberto Cano Buendía.

A mi prima María de los Ángeles Vázquez Delgado por siempre estar al pendiente de mi persona y también a los tres angelitos que tiene; Emanuel Gallástegui Vázquez, Panja y Aurora.

A la Familia Vázquez Delgado en especial a la Sra. Alicia Vázquez Delgado y al Sr. José Guadalupe Vázquez Delgado (†) y a mis primas y primos. Gracias por estar al pendiente.

A la Familia Quiñonez Guzmán en especial al Sr. José Alfonso Quiñonez Guzmán y a su esposa y a la Sra. Martha Quiñonez Guzmán (†).

A la Familia Aceituno Guzmán en especial al Sr. Julio Cesar Aceituno Guzmán y Sra. Julia Carolina Aceituno Guzmán y sus respectivas familias.

A mis amigos el MVZ. Luis Adrián Yáñez Garza, MVZ. Gimmell Astrid Estrada Alfaro, MVZ Lourdes Ramos Sánchez, MVZ. Magda Rico Tavera, MVZ. Hugo Cesar Sánchez Rivera, MVZ Luis Enrique Fernández Maya, MVZ Jorge Alfredo De la Garza García, MVZ. Erika Ornelas Eusebio y MVZ. Cinthya Isabel Santiago Barrientos.

A mis queridas hijas caninas: Liliana Maclovia Vázquez Aceituno y Florencia Valentina Vázquez Aceituno (†). Gracias a ustedes estoy en este camino.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por abrir las puertas de su laboratorio, por creer en mí, por enseñarme y permitirme desarrollar las habilidades necesarias para llevar a cabo esta tesis.

Al Personal del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Manuel Gea Gonzalez” por sus amables atenciones.

Al Dr. Armando Navarro Ocaña y a todo el personal que ahí labora (Biol. Delia Licona Moreno, Tec. Luis Antonio León Alamilla, y Tec. Gabriel Pérez Soto) en la torre de investigación de la facultad de medicina de la UNAM, por la ayuda prestada para realizar la serotipificación de los aislamientos usados en este trabajo

Al Dr. Bruno González Zorn de la Universidad Complutense de Madrid por la donación de los controles positivos para las PCR's de *armA*, *rmtB* y *rmtC*.

A los integrantes del jurado Dra. Inda Marcela Figueroa Ochoa, Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dra. Luary Carolina Martínez Chavarría, Dr. Francisco Aguilar Romero, Dr. Néstor Ledezma Martínez y el Dr. Rigoberto Hernández Castro por la revisión de la presente tesis.

Al M. en C. Jorge Alfredo de la Garza García y a la M.M.V.Z. Erika Ornelas Eusebio por la ayuda prestada en la realización de la serotipificación.

CONTENIDO

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 El género <i>Salmonella</i>	2
1.2 Resistencia a antimicrobianos	5
1.3 Resistencia a aminoglucósidos	7
1.4 Clasificación de los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos	12
1.4.1 Reducción de la concentración intracelular del antimicrobiano	12
1.4.1.1 Bombas de eflujo generales y específicas	12
1.4.1.2 Cambios en la membrana bacteriana.....	13
1.4.2 Modificación enzimática	13
1.4.2.1 Acetiltransferasas	14
1.4.2.2 Nucleotidiltransferasas.....	14
1.4.2.3 Fosfotransferasas	15
1.4.3 Modificación del sitio blanco	15
1.4.3.1 Mutaciones Ribosomales	15
1.4.3.2 Metiltransferasas de la subunidad ribosomal 16S ARNr.....	16
1.4.3.2.1 Identificación de las MTasas de 16S ARNr.....	19
2. Justificación.....	21
3. Hipótesis	22
4. Objetivo general	22
4.1 Objetivos específicos	22
5. Material y Métodos	23
5.1 Identificación bioquímica de <i>Salmonella</i>	23
5.2 Serotipificación	24
5.2.1 Tipificación del antígeno “O” (somático)	27
5.2.2 Tipificación del antígeno flagelar fase I.....	28
5.2.3 Tipificación del antígeno flagelar fase II.....	30
5.3 Identificación molecular de las cepas de <i>S. enterica</i> por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.....	30
5.4 Identificación de los genes de resistencia <i>armA</i> , <i>rmtB</i> y <i>rmtC</i> por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.....	31
6. Resultados	34
6.1 Identificación bioquímica y susceptibilidad a los quimioterapéuticos.....	34

6.2 Identificación molecular mediante el gen <i>invA</i>	36
6.3 Serotipificación	36
6.4 Identificación de los genes de resistencia <i>armA</i> , <i>rmtB</i> y <i>rmtC</i>	37
7. Discusión.....	41
8. Conclusiones.....	49
9. Bibliografía	51
10. Apéndice	71
10.1 Abreviaturas.....	71
10.2 Lista de cuadros.	73
10.3 Lista de figuras.	73

Resumen

VÁZQUEZ ACEITUNO VÍCTOR ALFONSO. Identificación de los genes *armA*, *rmtB* y *rmtC* asociados a resistencia a aminoglucósidos en aislados de *Salmonella enterica* de origen bovino (bajo la dirección de: MVZ Inda Marcela Figueroa Ochoa y MVZ Rigoberto Hernández Castro)

Los aminoglucósidos son antimicrobianos utilizados para tratar una gran variedad de infecciones causadas por bacterias gram negativas y gram positivas en el hombre y los animales. Estos antimicrobianos se ven afectados por diversos mecanismos de resistencia como enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cambios en la permeabilidad de la membrana, bombas de eflujo y mutaciones en el sitio blanco; sin embargo, las metiltransferasas de 16S ARNr (MTasas de 16S ARNr) confieren altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos utilizados en la clínica. Los genes responsables encontrados hasta ahora son once: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtD2*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH* y *npmA*. Estos han sido reportados en diferentes géneros de bacterias gram negativas como *S. enterica*, *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y otros géneros de importancia en salud animal y salud pública.

En el presente trabajo se identificaron aislamientos de *S. enterica* del recto de bovinos. Por el método automatizado Vitek®, se obtuvo el patrón de resistencia y la identificación bioquímica. Además, se realizó la serotipificación a cada uno de los aislamientos, y se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores específicos para identificar los genes *armA*, *rmtB* y *rmtC*. Adicionalmente se identificó el gen *invA*, que se utiliza para identificar al género *Salmonella*. Finalmente se identificaron 24 aislamientos como *S. Typhimurium* y un aislamiento de los serotipos *S. Muenchen*, *S. Gallinarum*, *S. Montevideo*, *S. Kentucky*, *S. Newport* y dos aislamientos con la fórmula O4,5; g,p,s. En la presente tesis se logró identificar el gen *armA* en dos aislamientos de *S. enterica* serotipo *Gallinarum* y *Typhimurium*, que previamente se había identificado en aislamientos de animales y el hombre. Este es el primer reporte del gen *armA* en México en aislamientos de *Salmonella* proveniente de bovino.

1. Introducción

1.1 El género *Salmonella*

El género *Salmonella* es un grupo diverso de microorganismos patógenos entéricos, que infectan al hombre y animales, y forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta familia generalmente habita (pero no exclusivamente) en el tracto gastrointestinal de animales y el hombre (1).

Este género comprende a bacilos gram negativos de 0.7-1.5 μm de ancho por 2-5 μm de largo, usualmente móviles por flagelos peritricos (a excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*). Son anaerobios facultativos, las colonias generalmente miden de 2-4 mm de diámetro, crecen a temperaturas entre 7°C-48°C con un crecimiento óptimo a 37°C y un pH de 4.05 a 9, y un a_w de 0.995 (2). Las pruebas bioquímicas características de *Salmonella* son: reducción de nitratos a nitritos, producción de gas a partir de glucosa, producción de ácido sulfhídrico en el medio TSI, indol negativo, utilización de citrato como fuente de carbón, lisina y ornitina descarboxilasa positivas, ureasa negativa, y no fermentan los siguientes carbohidratos: sucrosa, salicin, inositol y amigdalina (3).

El género contiene dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* se subdivide en seis subespecies, de acuerdo en diferencias fenotípicas o bioquímicas: *S. enterica subsp. enterica (I)*, *S. enterica subsp. salamae (II)*, *S. enterica subsp. arizonae (IIIa)*, *S. enterica subsp. diarizonae (IIIb)*, *S. enterica subsp. houtenae (IV)*, y *S. enterica subsp. indica (VI)*. La subespecie (V) está ligada a *S. bongori* (4-5).

La serotipificación tiene como fundamento la detección de antígenos de superficie como el antígeno O (antígeno somático termoestable), antígeno H (flagelina, antígeno termolábil) y si está presente, el antígeno Vi (antígeno capsular),

compuesto por ácido α -1,4 2-desoxi-2-N-acetilgalactosamina urónico (2). Los serotipos están asignados de acuerdo con la nómina de “Fórmulas antigénicas de serotipos de *Salmonella*” con 2659 serotipos hasta la fecha (6). Estos serotipos se han agrupado dentro de las 7 subespecies (Cuadro 1) (6,7).

Cuadro 1 Serotipos en cada especie y subespecie de <i>Salmonella</i>		
<i>S. enterica</i>	N	Hábitat
Subsp. <i>enterica</i>	1586	Animales de sangre caliente
Subsp. <i>salamae</i>	522	Animales de sangre fría
Subsp. <i>arizonae</i>	102	Animales de sangre fría
Subsp. <i>diarizonae</i>	338	Animales de sangre fría
Subsp. <i>houtenae</i>	76	Animales de sangre fría
Subsp. <i>indica</i>	13	Animales de sangre fría
<i>S. bongori</i>	22	Animales de sangre fría
Total	2659	
Tomado de: Issenhuth-Jeanjean S. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol 2014 Sep;165(7):526-30.		

Además, existe otra clasificación de los serotipos de acuerdo con la variedad de los hospederos en los que puede sobrevivir. Estos se pueden dividir en serotipos restringidos a un hospedero, serotipos adaptados al hospedero, y serotipos ubicuos o generales. Los primeros se refieren a serotipos que típicamente causan enfermedad sistémica en un hospedero exclusivamente, los siguientes se refieren a serotipos que son prevalentes en una especie, pero causan una enfermedad en otras especies y los últimos son capaces de causar enfermedad en una gran

variedad de hospederos en los que inducen gastroenteritis autolimitante (2,8). A continuación, se enlistan algunos de los hospederos y serotipos asociados, así como la enfermedad que ocasionan (8) (Cuadro 2).

Cuadro 2 Serotipos de <i>Salmonella</i> asociados a un hospedero específico y enfermedades		
Hospedero	Serotipos asociados	Enfermedad
Bovino	S. Dublín, S. Typhimurium	Septicemia, aborto, enteritis aguda o crónica.
Ovinos	S. Typhimurium	Colitis, aborto, septicemia
Suinos	S. Choleraesuis, S. Typhimurium, S. Typhisuis	Septicemia
Équidos	S. Typhimurium	Septicemia, colitis, y aborto
Aves	S. Gallinarum, S. Pullorum	Septicemia, enteritis aguda o crónica.
Humanos	S. Enteritidis, S. Typhi, S. Paratyphi	Gastroenteritis, bacteremia

Además de los antes mencionados, en bovinos podemos encontrar los siguientes serotipos reportados con mayor frecuencia: Montevideo, Dublin, Muenster, Kentucky, Anatum, Infantis, Cerro, Meleagridis, Newport y Typhimurium (9).

Las infecciones de *Salmonella* en bovinos son causa de mortalidad y morbilidad, y frecuentemente se encuentran animales con infección subclínica, lo que los convierte en reservorios de infección tanto para el hombre como para otras especies (10). Cuando enferman estos animales, presentan un cuadro agudo en el que se observa fiebre, anorexia, diarrea con heces fétidas con presencia de moco y hematoquecia. Este cuadro está presente durante 4 a 7 días hasta la muerte del animal. La mortalidad puede superar el 50% si no se da tratamiento y ser menor al 10% cuando se da tratamiento oportuno. En los becerros, además del cuadro anterior se presenta deshidratación, emaciación y en casos extremos la muerte (11).

Salmonella spp., es un agente zoonótico que se transmite vía alimentos contaminados, principalmente de origen animal como carne, huevos, y leche. En el hombre, una infección por este microorganismo causa gastroenteritis, diarrea, fiebre, dolor abdominal y náuseas (12). Se estima que anualmente existen 93.8 millones de casos de *Salmonella*, y que causa 155 mil muertes en el hombre asociadas a gastroenteritis. De estos casos, 86.5% están asociados a alimentos contaminados con el microorganismo (13).

1.2 Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad de una bacteria para sobrevivir a una concentración específica de un antimicrobiano conocido (14). Este fenómeno actualmente representa uno de los problemas de Salud Pública y Salud Animal a nivel mundial (15). La consecuencia más seria del uso de antimicrobianos es el desarrollo de cepas resistentes (16).

La resistencia se desarrolla como respuesta a la presión de selección ejercida por un antimicrobiano. Para que se desarrolle, se deben cumplir dos condiciones. 1) El antimicrobiano (selector) debe estar en contacto prolongado con la población bacteriana. 2) El selector debe estar en una concentración que permita que las bacterias sobrevivan (16,17). Esto se denomina concentración sub-inhibitoria (18).

La resistencia antimicrobiana puede ser una propiedad natural (resistencia intrínseca) o puede ser una propiedad adquirida (resistencia adquirida) (19). Las bacterias resistentes tendrán la capacidad de confrontar diferentes concentraciones de antimicrobiano, desde concentraciones bajas, concentraciones que inhiben el crecimiento microbiano (CMI), y concentraciones superiores a las que inhiben el

crecimiento bacteriano. Es importante hacer notar que las bacterias pueden tener más de un mecanismo de resistencia en contra de la misma clase de antimicrobiano, lo que da lugar a que puedan tolerar concentraciones muy altas de antimicrobianos (efecto aditivo) (17). A continuación, se presenta un cuadro con los diferentes mecanismos de resistencia y el nivel de resistencia que confieren (15) (Cuadro 3).

Cuadro 3 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.		
Mecanismo	Antimicrobiano	Nivel de resistencia que confiere
Bombas de eflujo	Tetraciclinas Macrólidos Quinolonas	Bajo
Disminución en la concentración de antimicrobiano	Beta-lactámicos Trimetoprim Tetraciclinas	Bajo
Alteración del sitio blanco	Beta-lactámicos Aminoglucósidos Macrólidos Quinolonas Rifampicina	Variable
Vía alterna a una ruta metabólica	Sulfas Trimetoprim	Alto
Enzimas modificadoras del antimicrobiano	Beta-lactámicos Aminoglucósidos Macrólidos Cloranfenicol Lincomicina	Alto

El origen de los genes que codifican para los mecanismos de resistencia es desconocido, sin embargo, es aceptado que estos genes originalmente pertenecían a organismos productores de antimicrobianos, los cuales utilizaban este mecanismo para evadir los efectos de los mismos (20, 21).

La resistencia a antimicrobianos puede ocurrir por medio de mutaciones cromosomales o por transmisión horizontal de genes (22).

La transferencia horizontal de genes por medio de la conjugación de plásmidos ha sido observada en diferentes nichos del ecosistema como en insectos, agua, suelo, en alimentos, y en patógenos de importancia en Salud Pública (23). La transferencia de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones entre bacterias sin ninguna relación filogenética, se ha descrito en la literatura, indicando que este mecanismo contribuye significativamente a la diseminación de genes de resistencia (24).

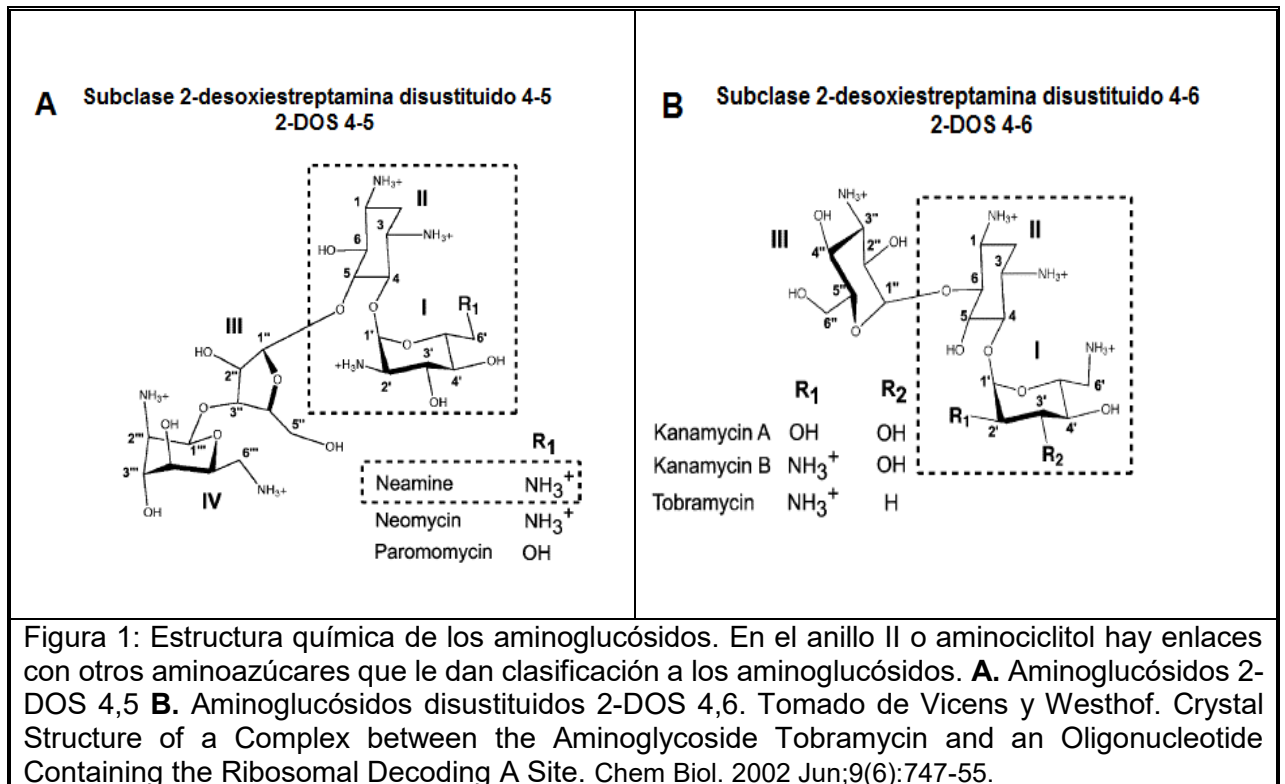
Los plásmidos, transposones e integrones son los principales sistemas de diseminación de genes de resistencia entre bacterias. Estos elementos usualmente contienen más de un gen de resistencia (22). Las cepas que adquieren estos plásmidos se denominan multirresistentes y la selección de las bacterias que los llevan, es debida al fenómeno de co-resistencia (la presión de selección ejercida por un antimicrobiano selecciona para varios mecanismos de resistencia contenidos en el plásmido) (17, 25).

1.3 Resistencia a aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son compuestos naturales producidos principalmente por actinomicetos de los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora*. Estos antimicrobianos cuentan con un amplio espectro y actividad bactericida en contra de bacterias gram negativas, micobacterias y son usados en conjunto con los beta-lactámicos. Estos compuestos tienen una fuerte carga positiva, son altamente solubles en agua, e insolubles en lípidos y tienen una mejor acción antibacteriana en medios alcalinos, son pobremente absorbidos por vía oral y penetran la barrera hematoencefálica de manera ineficiente. Debido a su carga positiva, los

aminoglucósidos son capaces de unirse a moléculas con carga negativa como el lipopolisacárido (LPS), ADN, ARN y fosfolípidos (26, 27, 28).

El término aminoglucósidos se debe a la estructura química de este grupo de antimicrobianos. Estos se componen de un anillo central llamado aminociclitol (núcleo) que está saturado por grupos hidroxilo y amino, unido a uno o más aminoazúcares por medio de enlaces glicosídicos (28) (Figura 1).



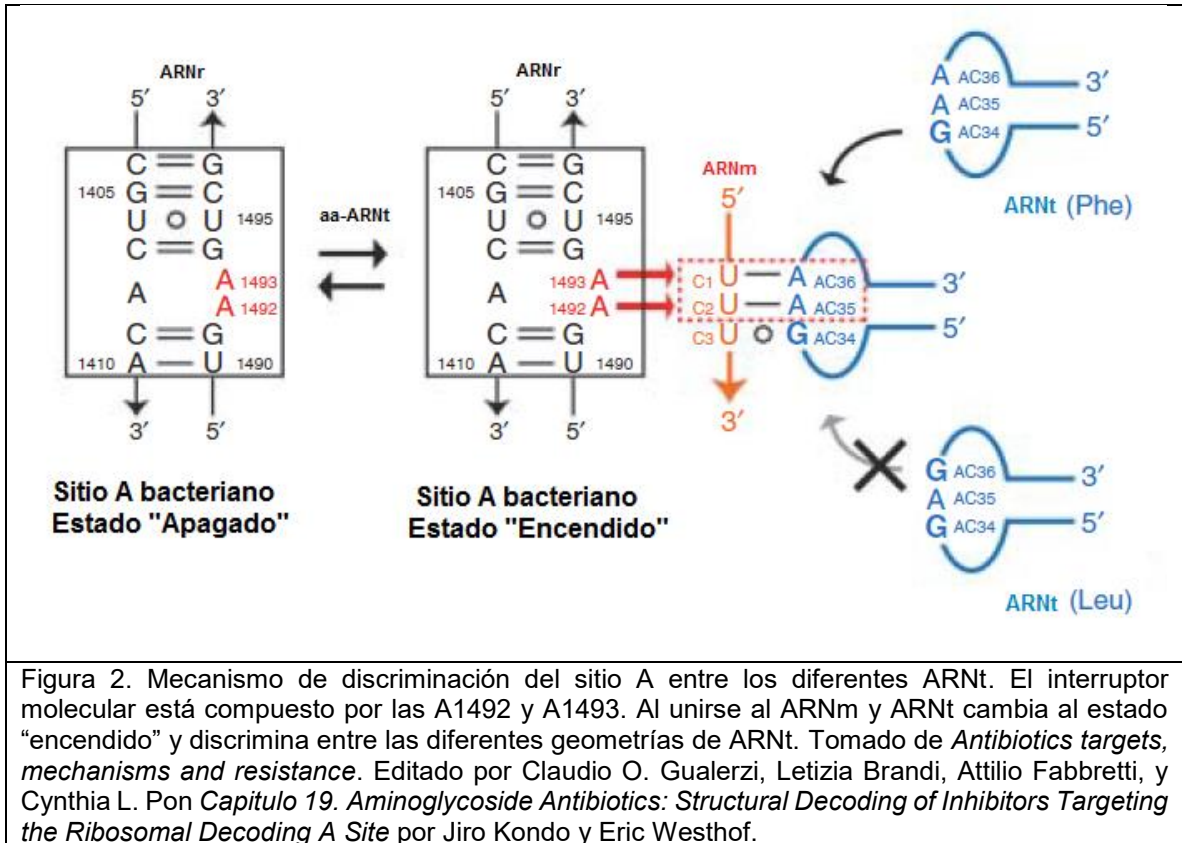
La clasificación de estos antimicrobianos tiene como base el anillo aminociclitol. Los que tienen el anillo aminociclitol 2-desoxiestreptoamina (2-DOS), son considerados como típicos y los que no tienen el anillo antes mencionado serán atípicos. Ejemplos de los aminoglucósidos típicos son: gentamicina, tobramicina, amikacina, arbekacina, netilmicina y sisomicina. Algunos ejemplos de aminoglucósidos atípicos son: estreptomina, espectinomina y fortimicina. Además de la clasificación

anterior, los aminoglucósidos típicos se clasifican de acuerdo a la posición de los enlaces glicosídicos entre el anillo aminociclitol y los aminoazúcares (29) (Cuadro 4).

Cuadro 4 Clasificación general de los aminoglucósidos						
Aminoglucósido	Típico o atípico	Aminociclitol	Natural (N) o Semisintético (S)	Origen	Año de Descubrimiento	
Gentamicina	Típicos	2-DOS 4,6 Disustituido	N	<i>M. purpurea</i>	1963	
Sisomicina			N	<i>M. inyoensis</i>	1970	
Isepamicina			S	Derivado de Gentamicina	1974	
Netilmicina			S	Derivado de Sisomicina	1975	
Kanamicina			N	<i>S. kanamiceticus</i>	1957	
Tobramicina			N	<i>S. teneabrius</i>	1967	
Dibekacina			S	Derivado de Bekanamicina	1971	
Amikacina			S	Derivado de Kanamicina	1972	
Arbekacina			S	Derivado de Bekanamicina	1973	
Neomicina			2-DOS 4,5 Disustituido	N	<i>S. fradie</i>	1949
Paromomicina				N	<i>S. kestromuceticus</i>	1950
Apramicina	2-DOS 4 sustituido	N		<i>S. teneabrius</i>	1968	
Higromicina		2-DOS 5 sustituido	N	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	1953	
Estreptomomicina	Atípicos	Estreptidina	N	<i>S. griseus</i>	1944	
Espectinomomicina		Actinamina	N	<i>S. spectabilis</i>	1961	
Fortimicina		Fortamina	N	<i>M. olivaterospora</i>	1977	

Se ha demostrado que los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas; unos inhiben la translocación en la síntesis de proteínas, lo que les confiere efecto bacteriostático (espectinomomicina y kasugamicina), y otros afectan la fidelidad en la lectura de codón-anticodon, lo que les confiere efecto bactericida (aminoglucósidos 2-DOS y estreptomomicina).

El efecto bactericida de los aminoglucósidos es debido a que se unen fuertemente a la subunidad ribosomal 16S, en el sitio A, interfiriendo así, en el proceso de la traducción, lo que afecta la fidelidad de la traducción y genera proteínas truncas o mal plegadas. La fidelidad en la traducción depende de dos pasos; el primer paso es el reconocimiento del codón en el ARNm y el anticodón en el ARNt y el segundo paso es la verificación. El sitio A del ribosoma bacteriano, está compuesto por las helices 34 y 44 de la subunidad ribosomal 16S ARNr. El sitio A tiene un interruptor molecular de ARN, compuesto por 15 nucleótidos en el que las adeninas A1492 y A1493 se encuentran en un bucle interno asimétrico, y estas son esenciales para la discriminación de ARNt (Figura 2). Los ARNt, se unen dentro de una hendidura formada por las hélices anteriormente mencionadas y los movimientos relativos de estos dominios están involucrados en el proceso de traducción y translocación (27). Cuando un complejo ARNm-ARNt es formado, A1492 y A1493 salen del bucle interno y participan en el reconocimiento del codón y anticodón (Conjugado), formando puentes de hidrógeno con las dos primeras bases, permitiéndole discriminar entre las diferentes geometrías de emparejamiento de bases (Estado "Encendido").



Cuando un aminoglucósido 2-DOS disustituido se une en el sitio de decodificación, causa un cambio conformacional similar a la formación de un complejo ARNm-ARNt y bloqueando el ribosoma en el estado "Encendido". Como consecuencia la afinidad del sitio A por un complejo no conjugado de ARNm-ARNt se incrementa, y evita que el ribosoma discrimine eficientemente entre los complejos conjugados y no conjugados (30,31).

Los efectos de las proteínas mal traducidas debido a los efectos de los aminoglucósidos son: el incremento de la permeabilidad pasiva debido a la incorporación de las proteínas trunca o mal plegadas, el aumento del transporte de aminoglucósidos, aumentando así la concentración del antimicrobiano dentro de la célula, la saturación de los ribosomas con aminoglucósidos, lo que provoca la

inhibición de la síntesis y ensamblaje de nuevos ribosomas, y lleva a una completa inhibición de síntesis de proteínas y por lo tanto a la muerte celular. Alternativamente, la producción de proteínas mal traducidas podría afectar otros procesos celulares vitales como la replicación del ADN (32-36).

1.4 Clasificación de los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos

Existen tres mecanismos generales de resistencia a aminoglucósidos: a) reducción de la concentración intracelular del antimicrobiano por medio de bombas de eflujo específicas o generales, o cambios en la permeabilidad de la membrana, b) inactivación enzimática, y c) alteración del sitio blanco, usualmente debido a una mutación espontánea o por modificación del sitio blanco por genes exógenos (Cuadro 5) (27, 37).

Cuadro 5. Mecanismos de resistencia en contra de aminoglucósidos	
Clase	Mecanismos de resistencia
Disminución de la concentración intracelular	Cambios en la membrana bacteriana
Modificación enzimática	Acetiltransferasas Nucleotidiltransferasas Fosfotransferasas
Modificación del sitio blanco	Mutaciones ribosomales Metiltransferasas de 16S ARNr

1.4.1 Reducción de la concentración intracelular del antimicrobiano

1.4.1.1 Bombas de eflujo generales y específicas

Las bombas de eflujo son bombas dependientes de energía (ATP); las bacterias que expresan de manera constitutiva estas bombas presentan resistencia a bajas concentraciones de varios antimicrobianos. Sin embargo, mutaciones en los genes que regulan la expresión de las bombas o la presencia del sustrato, pueden inducir la sobreexpresión de este mecanismo de resistencia. Originalmente se sabía que

estas bombas eran específicas para compuestos hidrofóbicos o anfipáticos y, por lo tanto, este mecanismo no afectaría a los aminoglucósidos. Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que los aminoglucósidos sí son sustratos de bombas de eflujo. La familia de las bombas de eflujo de mayor importancia para la resistencia a aminoglucosidos es la RND (*Resistance Nodulation cell Division*) (38,39).

1.4.1.2 Cambios en la membrana bacteriana

Los cambios en los componentes de la membrana bacteriana, involucrados en la unión electrostática del antimicrobiano con la superficie de la bacteria, provocan la disminución de la concentración de los aminoglucósidos. Se ha observado que aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* que exhiben niveles bajos de resistencia a gentamicina, tienen el lipopolisacárido con menor carga negativa que un aislamiento de campo, por lo tanto, tiene una menor afinidad por la gentamicina (40).

Otro mecanismo que disminuye la concentración intracelular bacteriana de los aminoglucósidos es la cápsula. Se ha observado que la cápsula mucoide que sintetizan algunas bacterias como *P. aeruginosa*, tiene las siguientes funciones: 1) adherencia al epitelio respiratorio, 2) la evasión de la fagocitosis y 3) disminuir la concentración intracelular bacteriana de los aminoglucósidos. Se ha propuesto que la cápsula polianiónica de este género bacteriano, actúa como una barrera física y iónica que secuestra a los aminoglucósidos (40).

1.4.2 Modificación enzimática

La modificación enzimática de los aminoglucósidos o enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) es el mecanismo de resistencia más importante, ya que

ocasiona la pérdida de afinidad del aminoglucósido por su sitio blanco. Existen tres clases de enzimas modificadoras de aminoglucósidos: las acetiltransferasas, las nucleotidiltransferasas y las fosfotransferasas (37).

1.4.2.1 Acetiltransferasas

Las aminoglucósido acetiltransferasas (AAC) catalizan una reacción de acetilación en uno de los cuatro grupos amino del antimicrobiano. La acetilación reduce cuatro veces la afinidad del aminoglucósido por el sitio blanco dentro del sitio A. Las acetiltransferasas se clasifican de acuerdo con la región selectiva en la que se lleva a cabo la reacción de acetilación en el aminoglucósido. AAC (1) lleva a cabo su reacción en el grupo amino en la posición 1 del segundo anillo, AAC (2') en la posición 2 del primer anillo, AAC (6') en el primer anillo del grupo amino en la posición 6, AAC (3) en la posición 3 del segundo anillo. Los genes que codifican estas enzimas se encuentran comúnmente en elementos genéticos móviles como transposones que se encuentran en plásmidos de resistencia.

1.4.2.2 Nucleotidiltransferasas

Las aminoglucósido nucleotidiltransferasas (ANT), catalizan la reacción entre el Mg-ATP y el aminoglucósido a la forma O-adenilada del fármaco, disminuyendo así la afinidad del aminoglucósido por el sitio A. Estas representan a la clase menos variada de las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos, en la que existen cinco clases de ANT identificadas hasta la fecha. Estas enzimas, al igual que las anteriores, se clasifican de acuerdo con el sitio donde se lleva a cabo su acción. ANT (6) y ANT (9) llevan a cabo su reacción en el segundo anillo, ANT (4') en el primer anillo, ANT (2'') y ANT (3'') en el tercer anillo. Los genes que codifican a estas enzimas se encuentran en el cromosoma y en plásmidos, y están ampliamente

distribuidos entre bacterias patógenas. La frecuencia con la que se encuentran estos genes, está dada por la selección de aminoglucósidos utilizados en la clínica (comúnmente los aminoglucósidos con resistencia a las ANT son tobramicina y gentamicina).

1.4.2.3 Fosfotransferasas

Las aminoglucósido fosfotransferasas (APH) representan un grupo numeroso de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y son particularmente relevantes en la clínica ya que están presentes en géneros gram positivos como *Enterococcus* y *Staphylococcus*. Los genes que codifican para estas enzimas son frecuentemente encontrados en bacterias multirresistentes asociados a transposones e integrones. Las APH se clasifican de acuerdo con la región donde se lleva a cabo la reacción de fosforilación, su substrato es el grupo hidroxilo. Las APH (4) y APH (6) fosforilan en anillo II en las posiciones 4 y 6, la APH (3') en el anillo I en la posición 3 y las enzimas APH (2'') y APH (3'') en el anillo III en las posiciones 2 y 3, respectivamente. Existen otras APH que fosforilan en otras posiciones en aminoglucósidos atípicos como la APH (9), que solo modifica a la espectinomicina y la APH (7'') que modifica a la higromicina (27, 37, 40).

1.4.3 Modificación del sitio blanco

1.4.3.1 Mutaciones Ribosomales

La resistencia a los aminoglucósidos también puede ocurrir por mutaciones en el sitio blanco, clínicamente es relevante en *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia asociada a estreptomina. *Mycobacterium* es uno de los géneros bacterianos que tiene una sola copia del operón ribosomal. Esto implica que una mutación puntual puede producir una población resistente a estreptomina. Las

mutaciones en el gen *rrs* (16S ARNr), asociadas con la resistencia a la estreptomicina, afectan la región de la horquilla 530 y al nucleótido 912, resultando en la pérdida de afinidad del antimicrobiano antes mencionado (40).

También, las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas ribosomales pueden alterar la actividad de los aminoglucósidos. Mutaciones en la proteína S12, generan resistencia hacia la estreptomicina en *M. tuberculosis* (40).

1.4.3.2 Metiltransferasas de la subunidad ribosomal 16S ARNr

Como se mencionó anteriormente, los aminoglucósidos son producidos por actinomicetos de los géneros *Micromonospora* y *Actinomyces*. Estos microorganismos son resistentes intrínsecamente a estos antimicrobianos (21), debido a la modificación ribosomal por las metiltransferasas de la subunidad 16S ARNr (MTasas de 16S ARNr), esto es debido a la metilación de nucleótidos específicos dentro de 16S, que obstaculizan la unión de los aminoglucósidos con su sitio blanco (41). Hasta hace unos años se desconocía si este mecanismo se encontraba en bacterias patógenas, hasta que en 2003 se reportó en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (42, 43).

La importancia de estas enzimas es que confieren niveles extraordinarios de resistencia a aminoglucósidos utilizados en clínica como gentamicina, tobramicina y amikacina. Los niveles de resistencia alcanzados son de 256 µg/mL o mayores. Para comprender el funcionamiento de estas enzimas, es necesario clasificarlas de acuerdo con el nucleótido donde llevan a cabo la modificación y el patrón de resistencia que confieren. El primer grupo está compuesto por las MTasas de 16S ARNr que modifican la posición 1405 que corresponde a una guanina en su séptima posición (N7-G1405). Estas confieren resistencia a los aminoglucósidos del grupo

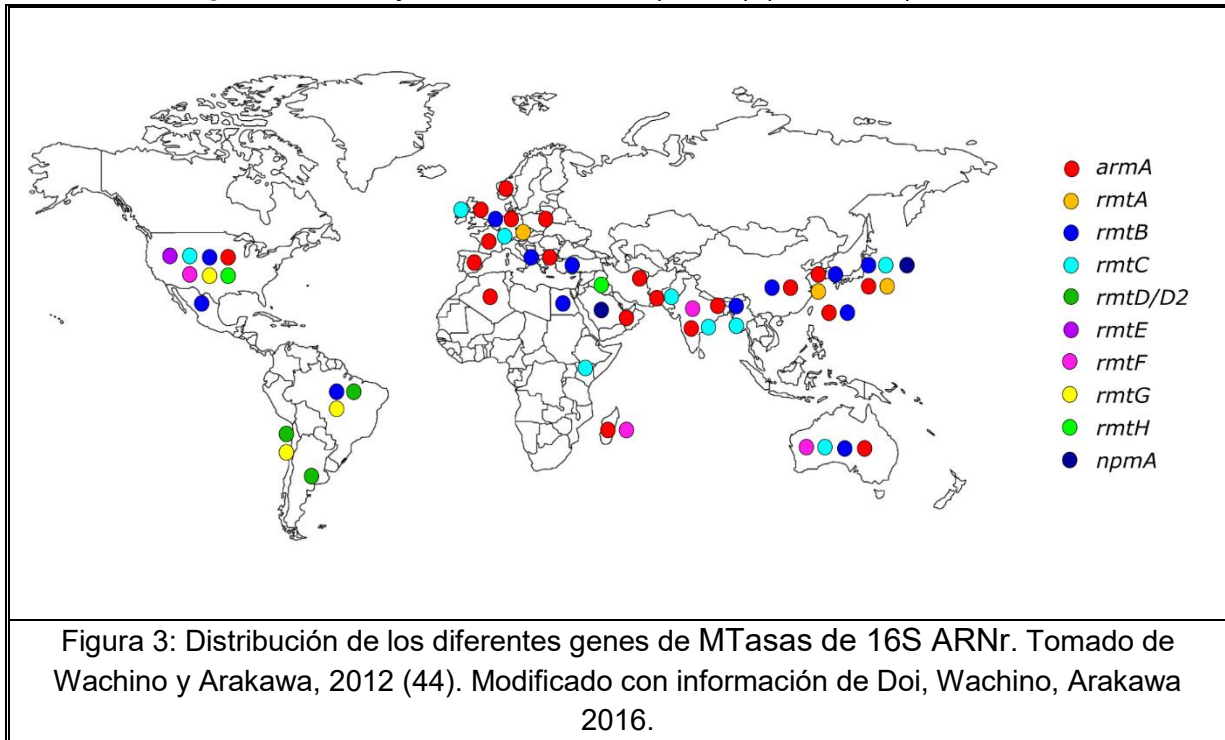
2-DOS 4,6 (gentamicina, kanamicina, amikacina, y tobramicina), pero no a los aminoglucósidos 2-DOS 4,5 (neomicina), los sustituidos (apramicina), o los que no contienen al núcleo 2-DOS (estreptomicina). El segundo grupo está compuesto por las enzimas que modifican la posición 1408 que corresponde a una adenina en su primera posición (N1-A1408). Estas confieren resistencia a los aminoglucósidos del grupo 2-DOS 4,6 (gentamicina, kanamicina, amikacina, y tobramicina), 2-DOS 4,5 (neomicina) y a los sustituidos (apramicina), pero no a los que no contienen al núcleo 2-DOS (estreptomicina) (Cuadro 6) (41,44, 45).

Cuadro 6		
Patrón de resistencia que confieren las diferentes MTasas de 16S ARNr		
Clases de aminoglucósido	N7-G1405	N1-A1408
2-DOS 4,6	R+	R
2-DOS 4,5	S	R+
2-DOS sustituidos	S	R+
Sin núcleo 2-DOS	S	S

R+: Altamente resistente, R: resistente, S: susceptible, 2-DOS: 2 desoxiestreptamina.
Tomado de Wachino y Arakawa, 2012.

Los genes de MTasas de 16S ARNr del grupo N7-G1405 son los siguientes: *armA* (*aminoglycoside resistance methylase*) (46), *rmtA* (*rRNA methyltransferase*) (43) *rmtB* (47), *rmtC* (48), *rmtD* (49), *rmtD2* (50), *rmtE* (51), *rmtF* (52), *rmtG* (53) y *rmtH* (54). El gen de MTasas de 16S ARNr del grupo N1-A1408 es *npmA* (*novel plasmid-mediated 16S rRNA N1-A1408 methyltransferase*) (55). Estos genes se encuentran distribuidos mundialmente (Figura 3); los genes que se encuentran con mayor frecuencia son *armA* y *rmtB*, los cuales están presentes en una gran variedad de bacterias gram negativas, como *K. pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*, que están asociadas a problemas intrahospitalarios. También se han encontrado reportes del gen *armA* en bacterias asociadas con enfermedades transmitidas por

alimentos y agentes causantes de diarrea, entre las cuales están *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* (44,45) (Cuadro 7).



Cuadro 7. Aislamientos de bacterias gram negativas en las que se detectó la presencia de MTasas de 16S ARNr en animales de producción, mascotas o alimentos.

Año	País	MTasas de 16S ARNr	Bacteria	Ganado Mascota Alimento	Referencia
2002	España	<i>armA</i>	<i>E. coli</i>	Cerdo	56
2002	China	<i>rmtB</i>	<i>E. coli</i>	Cerdo	57
2004-2007	Korea	<i>armA</i>	<i>E. coli</i>	Bovino Cerdo Aves	58
2005-2006	China	<i>rmtB</i>	<i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i>	Cerdo	59
2005-2006	China	<i>rmtB</i>	<i>E. coli</i>	Cerdo	60
2006-2008	China	<i>armA</i> y/o <i>rmtB</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>C. freundii</i> <i>E. cloacae</i>	Mascotas (Perro/gato)	61
2007	China	<i>rmtB</i>	<i>E. coli</i>	Pollo	62

2008	Reino Unido	<i>rmtC</i>	<i>S. enterica</i> serovar Virchow	Alimentos congelados	63
2008	China	<i>armA</i> y <i>rmtB</i>	<i>E. coli</i>	Pollo	64
2009	Isla de La Reunión	<i>armA</i>	<i>S. enterica</i>	Carne de pollo	65
2009	China	<i>amtB</i>	<i>E. coli</i>	Bovino	66
2010	China	<i>armA</i>	<i>S. enterica</i> serovar Paratyphi B	Pollo	67
2010	China	<i>rmtB</i>	<i>E. coli</i> <i>M. morgani</i> <i>L. adecarboxylata</i> <i>E. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i>	Cerdo (en heces y suelo)	68
Sin especificar	EE.UU.	<i>rmtE</i>	<i>E. coli</i>	Bovino	51

1.4.3.2.1 Identificación de las MTasas de 16S ARNr

La detección de las MTasas de 16S ARNr se realiza con fines epidemiológicos. La identificación de este mecanismo de resistencia es un reto, ya que el uso de métodos tradicionales como la concentración mínima inhibitoria (CMI) puede enmascarar su presencia (cuando más de una EMA están presentes en un microorganismo, este podría fácilmente ser resistente a múltiples aminoglucósidos). Por lo tanto, es importante el uso de pruebas que nos permitan discernir entre los diversos mecanismos de resistencia que afectan a los aminoglucósidos y las MTasas de 16S ARNr. El uso de la arbekacina para diferenciar entre las EMAs y las MTasas de 16S ARNr está recomendado ampliamente, porque aumenta el valor predictivo de la CMI en un 90%, esto se debe a que la arbekacina es un antimicrobiano que es refractario a las EMA a excepción de la enzima AAC(6'')/APH(2''). Sin embargo, la única desventaja de este método es que la arbekacina no está disponible a nivel mundial (69). Además, se ha propuesto el

punto de corte $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ para los aminoglucósidos en un antibiograma para la detección de estas enzimas. El uso de esta técnica tiene un valor predictivo excelente, ya que ha sido probada con diferentes enzimas del grupo N7-G1405 (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, y *rmtD*) (41).

El uso del antibiograma (CMI) además del uso de pruebas moleculares como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son actualmente las únicas formas de confirmar la presencia de estos genes de resistencia (41, 70-71).

2. Justificación

El género *Salmonella* representa una seria amenaza a la industria ganadera y alimentaria ya que muchos de sus serotipos son considerados como zoonosis. Aunado a esto, la presencia de las MTasas de 16S ARNr, presenta un escenario incierto y peligroso, debido a que hace inefectivos a los aminoglucósidos disponibles para terapia antimicrobiana. La identificación de estas enzimas a través de una metodología rápida, sensible y específica se ha vuelto una prioridad. Los métodos tradicionales como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y antibiograma, describen un patrón de resistencia o fenotipo, en el cual pueden estar involucrados uno o más mecanismos; pero no logran distinguir el mecanismo de resistencia involucrado. Hasta el momento, no existen trabajos en nuestro país enfocados en determinar las bases moleculares de la resistencia a los aminoglucósidos, por lo que es importante conocer la presencia de genes de resistencia asociados a tal mecanismo.

3. Hipótesis

Los aislamientos de *S. enterica* de origen bovino, presentarán resistencia a los aminoglucósidos debido a la presencia de los genes de resistencia *armA*, *rmtB* y *rmtC*.

4. Objetivo general

Identificar los genes de resistencia a aminoglucósidos *armA*, *rmtB* y *rmtC*, asociados a las metiltransferasas de la subunidad ribosomal 16S ARNr de cepas de *S. enterica* provenientes de bovinos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

4.1 Objetivos específicos

Realizar la identificación bioquímica, serológica y molecular de los aislamientos de *Salmonella*.

Determinar la susceptibilidad a los quimioterapéuticos mediante el sistema automatizado Vitek 2®.

Identificar por medio de la amplificación y la secuenciación, los genes de resistencia *armA*, *rmtB* y *rmtC*.

5. Material y Métodos

5.1 Identificación bioquímica de *Salmonella*

Se utilizaron 31 aislamientos procedentes del recto de bovinos productores de carne clínicamente sanos del estado de Veracruz, México en el año de 2010 (Cuadro 8).

Las cepas fueron identificadas bioquímicamente por medio del sistema automatizado Vitek 2® (bioMérieux, México); de igual manera, la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el mismo sistema (Tarjeta para resistencia a bacterias gram negativas).

Cuadro 8							
Aislamientos de <i>Salmonella</i> de bovinos.							
#	Identificación	#	Identificación	#	Identificación	#	Identificación
1	523	9	938	17	931	25	36
2	145	10	986	18	13	26	528
3	1065	11	989	19	987	27	925
4	413	12	491	20	146	28	921
5	1092	13	547	21	1037	29	1055
6	922	14	524	22	48	30	141
7	123	15	990	23	611	31	570
8	142	16	988	24	621		

Para la susceptibilidad a quimioterapéuticos se usaron los siguientes antibióticos de acuerdo a los puntos de corte del CLSI (*Clinical & Laboratory Standard Institute*) (72): ampicilina (AMP) (2-32 µg), amoxicilina con ácido clavulánico (AUG) (2-32 µg/1-16 µg), ampicilina con sulbactam (AMS) (2-32 µg/1-16 µg), piperacilina con tazobactam (PTZ) (4-128 µg/4 µg), cefazolina (CFZ) (4-64 µg), ceftazidima (CAZ) (1-64 µg), ceftriaxona (AXO) (1-64 µg), cefepima (FEP) (1-64 µg), imipenem (IMI)

(0.25-16 µg), meropenem (MEM) (0.25-16 µg), ertapenem, (ERP) (0.5-8 µg), aztreonam (AZT) (1-64 µg), amikacina (AMI) (2-64 µg), gentamicina (GEN) (1-16 µg), tobramicina (TOB) (1-16 µg), tigeciclina (TGC) (0.5-8 µg), ciprofloxacino (CIP) (0.25-4 µg), moxifloxacino (MXF) (0.25-4 µg), norfloxacino (NOR) (16-512 µg), sulfametoxazol con trimetoprim (SXT) (1-16 µg) y nitrofurantoína (NIT) (0.5-16 µg) (72).

5.2 Serotipificación

Para la serotipificación, se utilizaron diferentes medios:

a) Medio para el mantenimiento de la cepa (tubo de trabajo): se utilizaron tubos con medio agar tripticaseína de soya (TSA) inclinado (33 g/L).

Para la preparación de los antígenos:

a) Medio de motilidad (para 1000 mL): se utilizaron tubos con un medio que contiene gelatina (53 g), agar-agar (3 g) y caldo infusión cerebro corazón (BHI) (37g). Antes de que el medio solidifique se insertó una varilla de vidrio.

b) Medio para preparación del antígeno "O" (somático): se utilizaron tubos con agar tripticaseína de soya (33 g/L).

c) Medio para la preparación del antígeno "H" (flagelar): Se utilizaron tubos con caldo infusión cerebro corazón (BHI) (37 g/L).

d) Medio para la inducción de la fase II del antígeno flagelar (semisólido) (para 1000 mL): Se utilizaron cajas de Petri desechables de 5 cm de diámetro con un medio que contiene caldo tripticaseína de soya (33 g) adicionado con nitrato de potasio (1 g) y agar-agar (2 g).

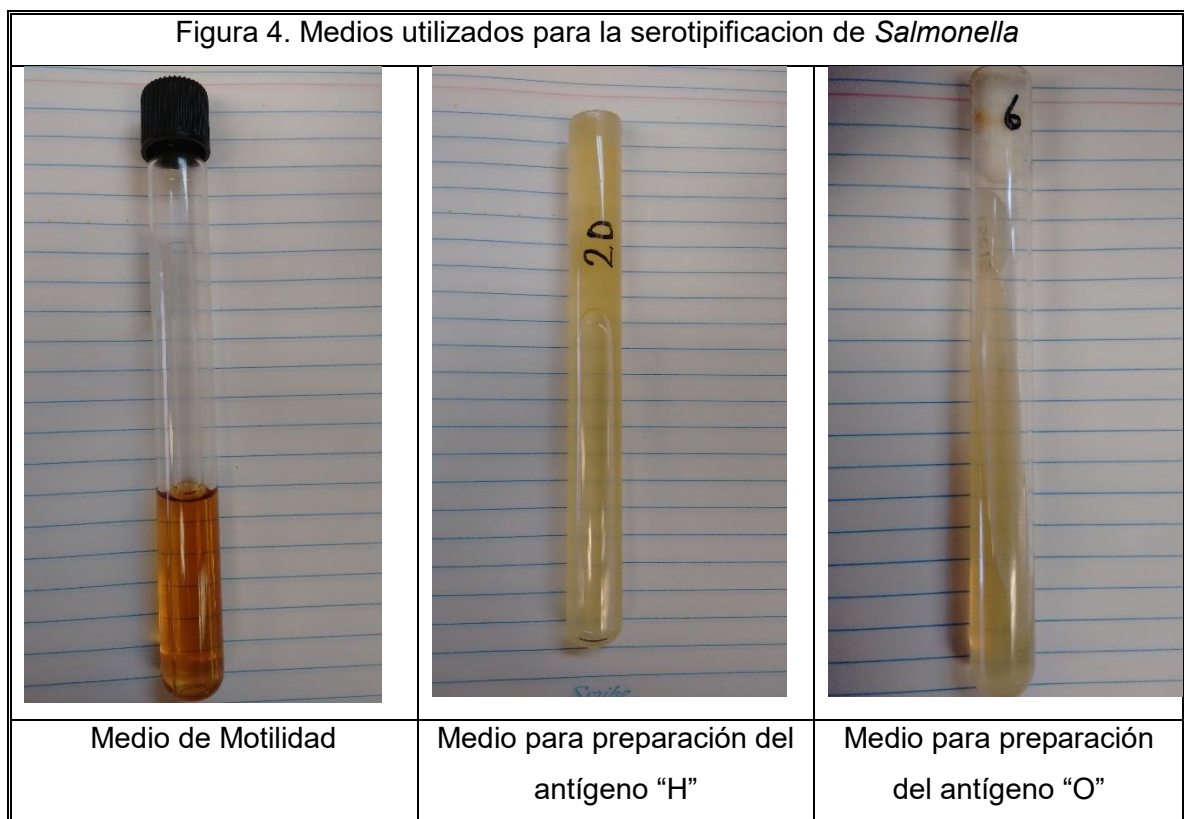
Para llevar a cabo la prueba de serotipificación, se prepararon los antígenos para la fase I y fase II del antígeno flagelar y además se preparó el antígeno somático. A continuación, se describe el proceso de preparación de cada uno.

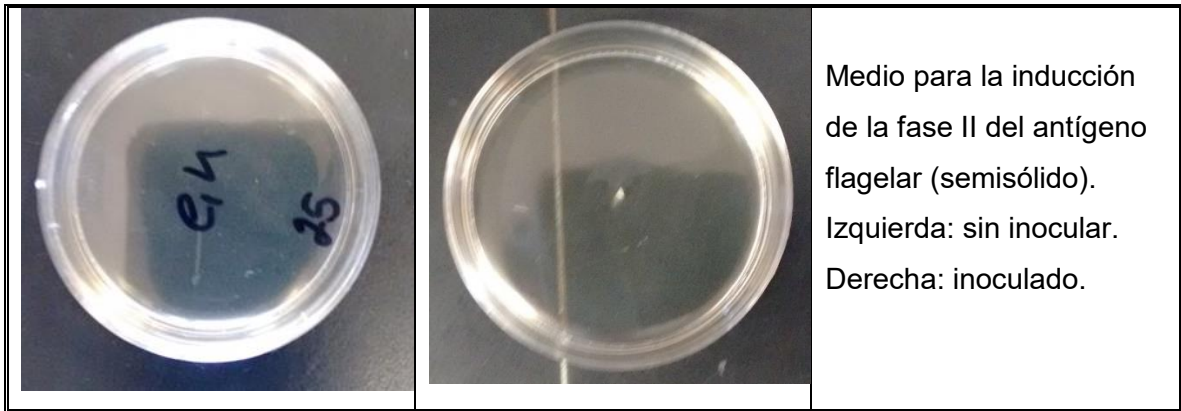
Antígeno somático: Del tubo de trabajo, se tomó una colonia y se inoculó por estría continua en el medio para preparación del antígeno somático y se incubó por 24 h a 37°C. Con 10 mL de solución salina fisiológica, se agregó al medio y se removió el crecimiento bacteriano por agitación o con ayuda de un asa bacteriológica estéril. La suspensión de bacterias se transfirió a un tubo con tapón de algodón y se colocó en la autoclave a 110°C por 45 min. Se esperó a que el antígeno estuviera a temperatura ambiente y se agregaron 10 mL de formalina al 10% y se agitó suavemente. Este antígeno se conservó a temperatura ambiente siempre y cuando el tubo permaneciera sellado.

Antígeno flagelar fase I: Del tubo de trabajo se sembró por picadura de asa una colonia en el medio de motilidad, en la parte interna del tubo hueco. Se dejó incubar a 30°C por 24 h. Posteriormente se recuperó un fragmento de agar de la periferia del tubo con un asa bacteriológica y se agregó en el caldo BHI, incubándose a 37°C por 24 h. Al finalizar, se agregaron 10 mL de formalina al 10%. Este antígeno se conservó entre 4°-8°C, sellado.

Antígeno flagelar fase II: De acuerdo con el resultado de la prueba de aglutinación para la fase I del antígeno flagelar, se usó el suero correspondiente para inducir la fase II en el medio semisólido. Se agregaron 50 µL del suero correspondiente en el centro de la caja del medio semisólido. Por otro lado, del medio de motilidad utilizado en la preparación del antígeno de la fase I, se tomó un fragmento de la periferia del tubo, y se agregó al medio semisólido, procurando mezclar el medio semisólido con

el fragmento del medio de motilidad y el antisuero. Este se incubó a 37°C por 24 h. Al término, se sembró un nuevo medio de motilidad, tomando un fragmento del medio semisólido (en el cual se observa un desplazamiento en oleada) y se inoculó en el tubo hueco de cristal, y se incubó a 37°C por 24 h. Posteriormente, se tomó un fragmento del medio anterior y se inoculó un tubo nuevo con caldo BHI, incubándose posteriormente a 37°C por 24 h. Al término, se agregó 10 mL de formalina al 10% y se agitó suavemente. Este antígeno se conservó entre 4°-8°C, sellado (Figura 4).





5.2.1 Tipificación del antígeno “O” (somático)

Para la tipificación del antígeno “O” se probaron los antígenos preparados en contra de los antisueros de los factores O2, O4, O5, O9, O6,7, O6,8 (C3), O8 (C2) y O7 (C1) (Figura 5). En caso de ser necesario se comprobó con antisueros en contra de otros factores o combinaciones de los factores antes mencionados. La prueba de aglutinación se llevó a cabo en micro placas de 96 pozos y se agregaron los antisueros en el siguiente orden:

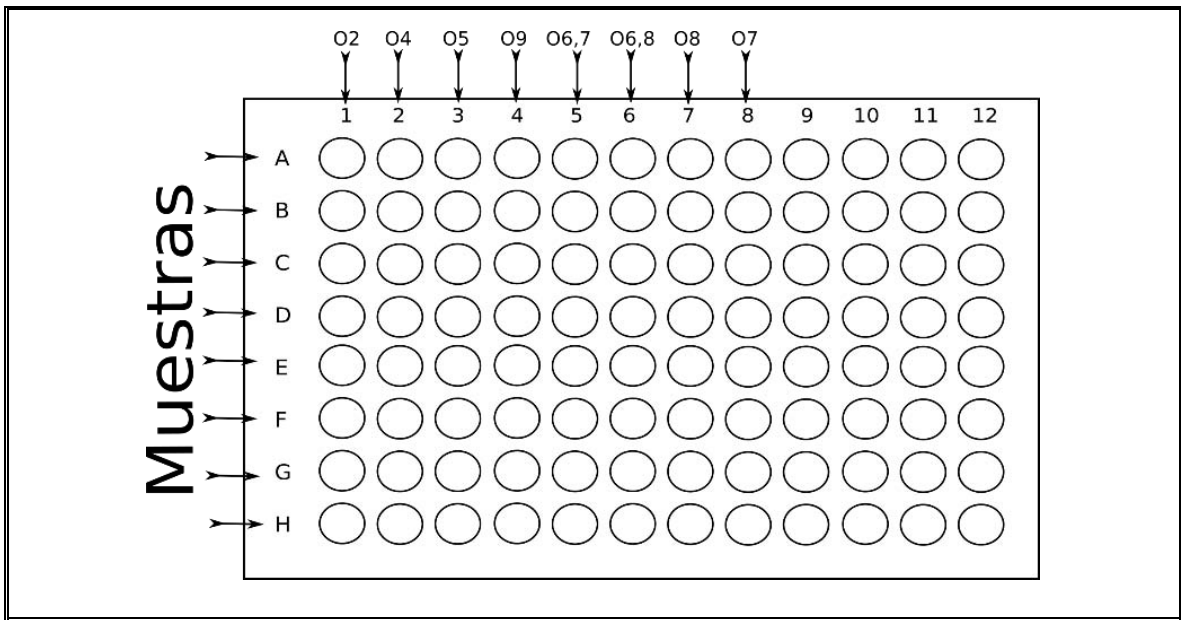


Figura 5. Esquema identificación del antígeno somático de *Salmonella* por medio de la prueba de aglutinación. Columna 1: Antisuero O2; Columna 2: antisuero O4; Columna 3: antisuero O5; Columna 4: antisuero O9; Columna: antisuero O6,7; Columna 6: antisuero O6,8; Columna 7: antisuero O8; Columna 8: antisuero O7.

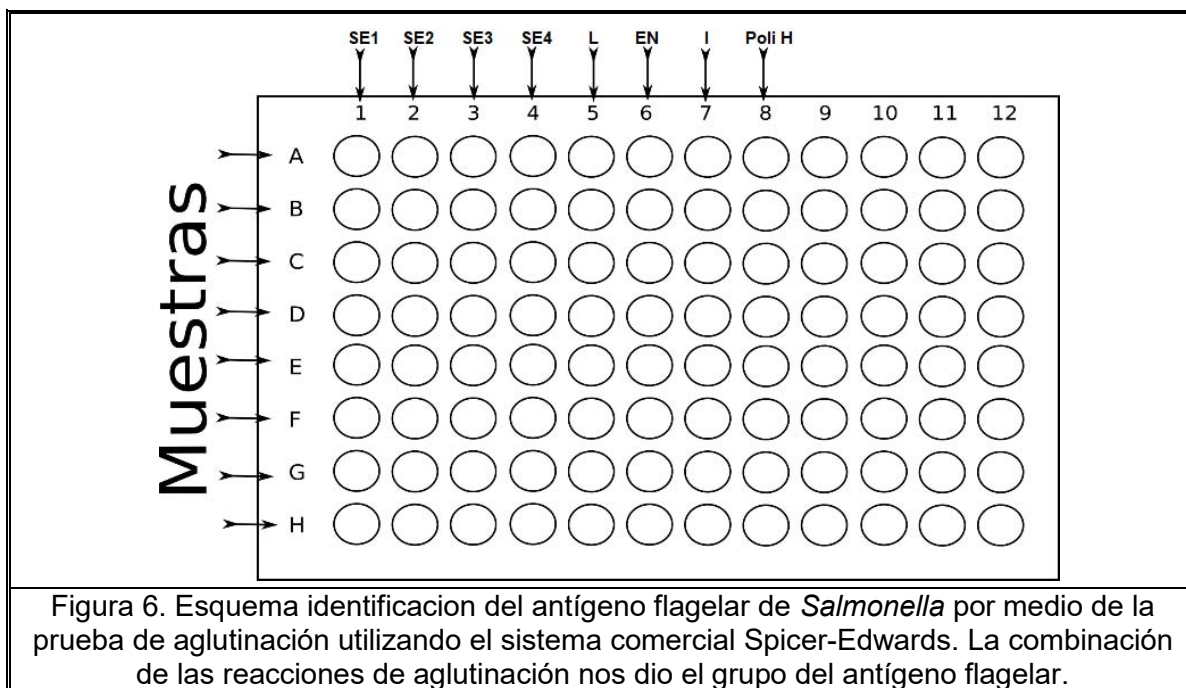
Cada aglutinación se llevó a cabo en un volumen de 100 μ L, agregando 80 μ L del antígeno y 20 μ L del antisuero. Se dejó por 24 h y al término se hizo la lectura de cada uno de los pozos. Dependiendo de la intensidad de la aglutinación se le da una calificación con cruces: (4+) 100% de aglutinación, sin antígeno libre (el fondo se ve claro a ligeramente brumoso), (3+) 75% de aglutinación y 25% del antígeno libre (el fondo se ve ligeramente brumoso), (2+) 50% de aglutinación y 50% del antígeno libre (el fondo se ve moderadamente brumoso), (1+) 25% de aglutinación y 75% de antígeno libre (el fondo se ve brumoso). La prueba de aglutinación se dio como positiva cuando alguno de los antisueros tuvo una calificación mayor o igual a 3+, y fue negativa cuando la aglutinación fue menor a 3+ o retardada.

5.2.2 Tipificación del antígeno flagelar fase I

Para la tipificación del antígeno H fase I, se utilizó el esquema de Spicer modificado por Edwards (Spicer-Edwards) como prueba tamiz, además de los antisueros poli H, EN, L e I. En este esquema se utilizaron cuatro sueros polivalentes que contienen diferentes combinaciones de los factores a, b, c, d, e, h, Complejo G (que contiene a los factores f, g; f, g, s; f, g, t; g, m; g, m, q; g, m, s; g, m, s, t; g, m, t; g, p; g, p, s; g, p, u; g, q; g, s, t; g, t; m, p, t, u; m, y t), i, k, r, y, z, Complejo z₄ (que contiene a los factores Z₄, Z₂₃; Z₄, Z₂₄; Z₄, y Z₃₂), Z₁₀ y Z₂₉. (Spicer 1956 y Edwards 1962) (73-74).

Los sueros polivalentes de Spicer-Edwards (SE1-SE4) contienen una combinación de factores que está descrita en el cuadro 9 (por ejemplo, el suero SE1 tiene los siguientes factores: a, b, c, e,h; complejo G e i). Para la prueba se utilizaron microplacas de 96 pozos, a las que se agregaron 20 μ L de los antisueros y 80 μ L

de los antígenos preparados previamente. Los antisueros usados se colocaron en la microplaca en el siguiente orden (Figura 6):



De acuerdo con el patrón de aglutinación encontrado, se puede clasificar los siguientes antígenos H:

Cuadro 9 Posibles resultados del sistema comercial Spicer-Edwards para la tipificación del antígeno flagelar.				
Antígenos H	Antisueros H de <i>Salmonella</i> de Spicer-Edwards			
	SE1	SE2	SE3	SE4
a	+	+	+	-
b	+	+	-	+
c	+	+	-	-
d	+	-	+	+
e,h	+	-	+	-
Complejo G	+	-	-	+
i	+	-	-	-
k	-	+	+	+
r	-	+	-	+

y	-	+	-	-
z	-	-	+	+
z4	-	-	+	-
z10	-	-	-	+
Z29	-	+	+	-

Posteriormente los antígenos se desafiaron con sueros monovalentes para corroborar el esquema de Spicer-Edwards. Si el antígeno resultaba ser del complejo G, este se probó en contra de los diferentes antisueros del complejo G (f, g; f, g, s; f, g, t; g, m; g, m, q; g, m, s; g, m, s, t; g, m, t; g, p; g, p, s; g, p, u; g, q; g, s, t; g, t, m, p, t, u; m, y t) para encontrar los diferentes factores que formaron la fase I de este antígeno. Si el antígeno resultaba ser i, se probaron los factores i,2; i,5; i,6 e i,7.

5.2.3 Tipificación del antígeno flagelar fase II

Para la inducción de la fase II del antígeno flagelar, se utilizó medio semisólido con el antisuero en contra de la fase I del antígeno flagelar, y del cual se preparó un antígeno y posteriormente se reevaluó de acuerdo al esquema Spicer-Edwards además de los antisueros poli H, EN, L e I. Dependiendo del factor encontrado, se usaron factores adicionales (73-74).

5.3 Identificación molecular de las cepas de *S. enterica* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

Los aislamientos se identificaron molecularmente mediante la técnica de PCR a partir de colonia bacteriana. Se utilizaron los iniciadores 5'-GTG-AAA-TTA-TCG-CCA-CGT-TCG-GGC-AA-3' y 5'-TCA-TCG-CAC-CGT-CAA-AGG-AAC-C-3' que amplifican un fragmento de 284 pb del gen *invA* descrito por Rahn *et al.* (75). Para

las reacciones de amplificación se utilizó el sistema comercial TopTaq Master Mix (Qiagen, Ventura CA, USA) siguiendo las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μL que contiene: 12.5 μL de TopTaq Master Mix (1.25 unidades TopTaq DNA polimerasa, buffer de PCR 1X con 1.5 mM de MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP), 1 μL de cada iniciador a una concentración de 25 pmol y 10.5 μL de agua grado biología molecular, así como una colonia fresca del cultivo de *Salmonella* en medio de cultivo agar TSA (cultivos puros de 18 h). El protocolo de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30s, alineación a 55°C por 30s y extensión a 72°C por 30s y una extensión final a 72°C por 5 min.

5.4 Identificación de los genes de resistencia *armA*, *rmtB* y *rmtC* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

Para la detección de los genes *armA*, *rmtB* y *rmtC* se amplificó un fragmento de los genes por medio de la técnica de PCR (43). Para el gen *armA*, se utilizaron los iniciadores armA-F 5'-ATT-CTG-CCT-ATC-CTA-ATT-GG-3' y armA-R 5'-ACC-TAT-ACT-TTA-TCG-TCG-TC-3' para amplificar un producto de 315 pb; para el gen *rmtB* se utilizaron los iniciadores rmtB-F 5'-GCT-TTC-TGC-GGG-CGA-TGT-AA-3' y rmtB-R 5'-ATG-CAA-TGCC-GCG-CTC-GTA-T-3', que amplifican un producto de 173 pb; para el gen *rmtC* se utilizaron los iniciadores rmtC-F 5'-CGA-AGA-AGT-AAC-AGC-CAA-AG-3' y rmtC-R 5'-ATC-CCA-ACA-TCT-CTC-CCA-CT-3' para amplificar un producto de 711 pb. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μL que contiene: 2.5 unidades DNA polimerasa, 5 μL de buffer de PCR 5X, 5 μL de MgCl_2 25 mM, 1 μL de dNTP a 100 μM (25 μM cada uno), 2 μL de cada

iniciador a una concentración de 25 pmol, 6.5 μ L de H₂O grado biología molecular y 4 μ L de DNA plasmídico (5 ng/ μ L).

El ADN plasmídico utilizado para las reacciones anteriores, fue extraído por medio del kit comercial QuickLyse miniprep (Qiagen, Ventura CA, USA), utilizando las instrucciones del fabricante.

El protocolo de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 96°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 96°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min.

Se utilizaron como controles positivos cepas que contienen los genes antes mencionados. Para el gen *armA* se utilizó una cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pMUR050 que contiene el gen *armA*; para el gen *rmtB* se utilizó una cepa *E. coli* DH5 α transformada con un plásmido que contiene al gen *rmtB*, y para el gen *rmtC* se utilizó una cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pTOPO que contiene el gen *rmtC*. Los controles fueron crecidos en agar o caldo LB (Luria Bertani) con 200 μ g/mL de gentamicina. Las cepas fueron donadas amablemente por el Dr. Bruno González Zorn del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España.

Para visualizar los productos de PCR, se utilizaron geles de agarosa al 2%. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis a 90V por 60 min, y fueron teñidos con bromuro de etidio y digitalizados en un fotodocumentador (Gel Logic 212 Pro®, Carestream, Rochester, NY).

Para verificar la secuencia de nucleótidos de los productos de amplificación de los genes *armA*, *rmtB* y *rmtC*, los productos de PCR fueron secuenciados en ambos sentidos con el equipo 3500xL Genetic Analyzer de Thermo Fisher Scientific®

(Instituto de Biotecnología, UNAM), utilizando los mismos iniciadores de amplificación (100 ng de producto amplificado y 10 pmol de cada primer). La secuencia se analizó en el programa computacional Vector NTI 11.5.1 Advance® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) generando una secuencia consenso, la cual fue sometida a la base de datos del GenBank, para buscar homologías en la plataforma Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

6. Resultados

6.1 Identificación bioquímica y susceptibilidad a los quimioterapéuticos

Por medio del sistema automatizado Vitek 2®, todos los aislamientos fueron identificados como *Salmonella* spp. Además, el sistema permitió la identificación de la muestra 523 como *Salmonella* Gallinarum.

Por otro lado, se determinó la prueba de susceptibilidad a quimioterapéuticos, en donde se observó que todos los aislamientos presentaron resistencia a cuatro quimioterapéuticos (CFZ, AMI, GEN y TOB). También, se observó resistencia a AMP en 7 aislamientos (21.8%), SXT en dos aislamientos (6.25%), NIT en dos aislamientos (6.25%) y en un aislamiento con cada uno de los siguientes antimicrobianos CAZ, AXO y AMS (3.12%). Asimismo, se determinó susceptibilidad intermedia a NIT en catorce aislamientos, AMS en dos aislamientos y AUG con un aislamiento. Todos los aislamientos fueron sensibles a PTZ, FEP, IMI, MEM, ERT, AZT, TGC, CIP, MOX y NOR (Cuadro 10).

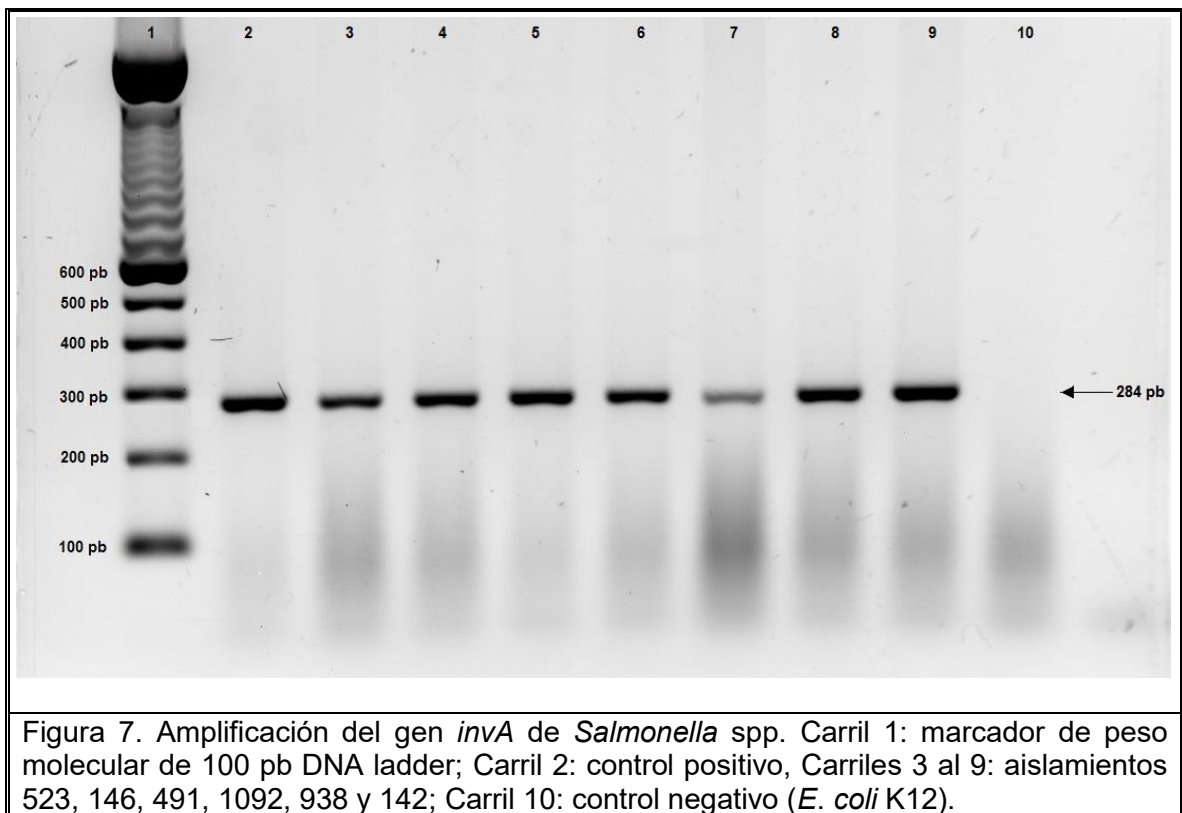
Cuadro 10
Determinación del perfil de sensibilidad a los antimicrobianos en los aislamientos de
***Salmonella* spp.**

No	Identificación	A M P	A U G	A M S	P T Z	C F Z	C A Z	A X O	F E P	I M I	M E M	E R P	A Z T	A M E N	G E N	T O B	T G C	C I P	M X F	N O R	S O X	N I T	
1	523	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
2	145	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
3	1065	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
4	413	R	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
5	1092	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
6	922	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
7	123	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
8	142	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
9	938	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
10	986	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
11	989	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
12	491	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
13	547	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
14	524	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
15	990	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
16	988	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
17	931	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
18	13	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
19	987	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
20	146	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
21	1037	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S
22	48	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
23	611	R	I	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	I
24	621	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
25	36	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
26	528	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
27	925	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
28	921	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
29	1055	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
30	141	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I
31	570	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	I

Ampicilina (AMP), amoxicilina con ácido clavulánico, (AUG), ampicilina con sulbactam (AMS), piperacilina con tazobactam (PTZ), cefazolina (CFZ), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (AXO), cefepima (FEP), imipenem (IMI), meropenem (MEM), ertapenem, (ERP), aztreonam (AZT), fosfomicina (FOS), amikacina (AMI), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), tigeciclina (TGC), ciprofloxacino (CIP), moxifloxacino (MXF), norfloxacino (NOR), sulfametoxazol con trimetoprim (SXT) y nitrofurantoína (NIT).

6.2 Identificación molecular mediante el gen *invA*

Para la identificación molecular se realizó la amplificación de un fragmento del gen *invA* y se encontró que los 32 aislamientos amplificaron el producto esperado de 284 pares de bases, por lo que los aislamientos pertenecen al género *Salmonella*. (Figura 7).



6.3 Serotipificación

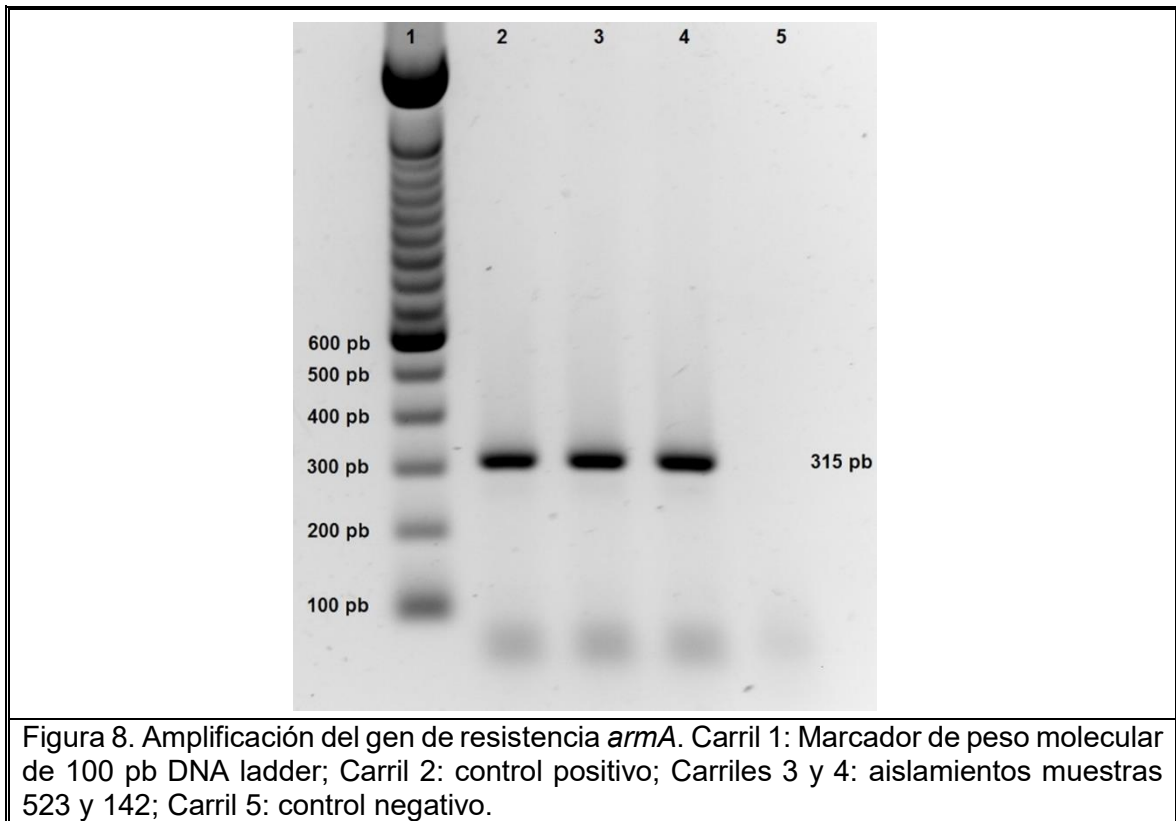
Después de realizar la determinación de antígenos somáticos y flagelares se determinó el serotipo de 29 aislamientos. Veinticuatro corresponden al serotipo Typhimurium (78.125%), un aislamiento corresponde a cada uno de los siguientes serotipos: Gallinarum, Muenchen, Montevideo, Kentucky, y Newport (3.125% cada uno). El aislamiento 523 que había sido previamente identificado por el sistema

Vitek 2 como *S. Gallinarum* fue corroborado por esta metodología. Dos aislamientos no pudieron ser identificados serológicamente y solo se determinó la fórmula antigénica O4, 5; g, p, s (6.25%) (Cuadro 11).

Número	Identificación	Serotipo	Número	Identificación	Serotipo
1	523	Gallinarum	17	931	Typhimurium
2	145	Typhimurium	18	13	Typhimurium
3	1065	Muenchen	19	987	Typhimurium
4	413	Typhimurium	20	146	Typhimurium
5	1092	Montevideo	21	1037	O4,5; g,p,s
6	922	Kentucky	22	48	Typhimurium
7	123	Newport	23	611	O4,5; g,p,s
8	142	Typhimurium	24	621	Typhimurium
9	938	Typhimurium	25	36	Typhimurium
10	986	Typhimurium	26	528	Typhimurium
11	989	Typhimurium	27	925	Typhimurium
12	491	Typhimurium	28	921	Typhimurium
13	547	Typhimurium	29	1055	Typhimurium
14	524	Typhimurium	30	141	Typhimurium
15	990	Typhimurium	31	570	Typhimurium
16	988	Typhimurium			

6.4 Identificación de los genes de resistencia *armA*, *rmtB* y *rmtC*

De los 31 aislamientos que se trabajaron, en solo 2 (6.45%) se encontró la presencia del gen de resistencia *armA*; los aislamientos positivos al gen fueron el 523 que corresponde a *Salmonella* Gallinarum y el 142 que corresponde a *Salmonella* Typhimurium (Figura 8). Los demás aislamientos fueron negativos a los genes *armA*, *rmtB* y *rmtC*.



Los dos productos amplificados fueron secuenciados en ambos sentidos y se generaron dos secuencias consenso, las cuales fueron sometidas a la base de datos del GenBank y se encontró una homología del 100% con 63 secuencias del gen *armA* de tres serotipos de *Salmonella enterica* (Thompson, Paratyphi y Stanley), así como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella michiganensis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* y 99 % de homología con *Leclercia adecarboxylata* (Figura 9 y Cuadro 12).

		151		200
armA	(151)	ATATGGGG	GTCTTACTATTCTGCCTATCCTAATTGG	GATAAATTATTAAA
142 armA F	(1)	-----	GTCTTACTATTCTGCCTATCCTAATTGGGATAAATTATTAAA	
142 armA R	(1)	-----	GTCTTACTATTCTGCCTATCCTAATTGGGATAAATTATTAAA	
523 armA F	(1)	-----	GTCTTACTATTCTGCCTATCCTAATTGGGATAAATTATTAAA	
523 armA R	(1)	-----	G	GTCTTACTATTCTGCCTATCCTAATTGGGATAAATTATTAAA
Consensus	(151)		GTCTTACTATTCTGCCTATCCTAATTGGGATAAATTATTAAA	
		201		250
armA	(201)	AAAGTACAATCAGGGGCAGTTATCAATAGAAGATTTACTAAAGATTTCATT		
142 armA F	(43)	AAAGTACAATCAGGGGCAGTTATCAATAGAAGATTTACTAAAGATTTCATT		
142 armA R	(43)	AAAGTACAATCAGGGGCAGTTATCAATAGAAGATTTACTAAAGATTTCATT		
523 armA F	(43)	AAAGTACAATCAGGGGCAGTTATCAATAGAAGATTTACTAAAGATTTCATT		
523 armA R	(44)	AAAGTACAATCAGGGGCAGTTATCAATAGAAGATTTACTAAAGATTTCATT		
Consensus	(201)	AAAGTACAATCAGGGGCAGTTATCAATAGAAGATTTACTAAAGATTTCATT		
		251		300
armA	(251)	CTTCGACGAATGAAAGAGTCGCAACATTAATGACTTTTACACTTATGTA		
142 armA F	(93)	CTTCGACGAATGAAAGAGTCGCAACATTAATGACTTTTACACTTATGTA		
142 armA R	(93)	CTTCGACGAATGAAAGAGTCGCAACATTAATGACTTTTACACTTATGTA		
523 armA F	(93)	CTTCGACGAATGAAAGAGTCGCAACATTAATGACTTTTACACTTATGTA		
523 armA R	(94)	CTTCGACGAATGAAAGAGTCGCAACATTAATGACTTTTACACTTATGTA		
Consensus	(251)	CTTCGACGAATGAAAGAGTCGCAACATTAATGACTTTTACACTTATGTA		
		301		350
armA	(301)	TTTGAAATATCAAACATGTCTCATCTATTTTAGATTTTGGTTGTGGCTT		
142 armA F	(143)	TTTGAAATATCAAACATGTCTCATCTATTTTAGATTTTGGTTGTGGCTT		
142 armA R	(143)	TTTGAAATATCAAACATGTCTCATCTATTTTAGATTTTGGTTGTGGCTT		
523 armA F	(143)	TTTGAAATATCAAACATGTCTCATCTATTTTAGATTTTGGTTGTGGCTT		
523 armA R	(144)	TTTGAAATATCAAACATGTCTCATCTATTTTAGATTTTGGTTGTGGCTT		
Consensus	(301)	TTTGAAATATCAAACATGTCTCATCTATTTTAGATTTTGGTTGTGGCTT		
		351		400
armA	(351)	CAATCCATTAGCTTTATACCAATGGAATGAAAATGAAAAATAATATATC		
142 armA F	(193)	CAATCCATTAGCTTTATACCAATGGAATGAAAATGAAAAATAATATATC		
142 armA R	(193)	CAATCCATTAGCTTTATACCAATGGAATGAAAATGAAAAATAATATATC		
523 armA F	(193)	CAATCCATTAGCTTTATACCAATGGAATGAAAATGAAAAATAATATATC		
523 armA R	(194)	CAATCCATTAGCTTTATACCAATGGAATGAAAATGAAAAATAATATATC		
Consensus	(351)	CAATCCATTAGCTTTATACCAATGGAATGAAAATGAAAAATAATATATC		
		401		450
armA	(401)	ATGCATACGATATTGATAGAGCTGAGATAGCTTTTTTGAGTAGCATTATT		
142 armA F	(243)	ATGCATACGATATTGATAGAGCTGAGATAGCTTTTTGAGTAGCATTATT		
142 armA R	(243)	ATGCATACGATATTGATAGAGCTGAGATAGCTTTTTGAGTAGCATTATT		
523 armA F	(243)	ATGCATACGATATTGATAGAGCTGAGATAGCTTTTTGAGTAGCATTATT		
523 armA R	(244)	ATGCATACGATATTGATAGAGCTGAGATAGCTTTTTGAGTAGCATTATT		
Consensus	(401)	ATGCATACGATATTGATAGAGCTGAGATAGCTTTTTGAGTAGCATTATT		
		451		500
armA	(451)	GGGAAGTTAAAGACGACGATAAAGTATAGGTTTTGAATAAAGAGAGTGA		
142 armA F	(293)	GGGAAGTTAAAGACGACGATAAAGTATAGGTTTTGAATA-----		
142 armA R	(293)	GGGAAGTTAAAGACGACGATAAAGTATAGGTTTTGAATAAAG-----		
523 armA F	(293)	GGGAAGTTAAAGACGACGATAAAGTATAGGTTTTGAATAAAG-----		
523 armA R	(294)	GGGAAGTTAAAGACGACGATAAAGTATAGGTTTTGAATAAAG-----		
Consensus	(451)	GGGAAGTTAAAGACGACGATAAAGTATAGGTTTTGAATAAAG		

Figura 9. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los aislamientos de *Salmonella* 142 y 523 con el gen *armA*. En amarillo se observa la homología en las secuencias y en color verde se encuentran señalados los iniciadores que se utilizaron.

Cuadro 12 Homología en la secuencia obtenida del gen <i>armA</i> , comparada con la base de datos del GenBank.	
Organismo	Homología
<i>Acinetobacter baumannii</i> cepa CMCCRMDRAB66	100%
<i>Providencia rettgeri</i> cepa RB151	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa 1819 plásmido IS26	100%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa KP5 plásmido pSg12	100%
<i>Citrobacter freundii</i> strain B38 plásmido pOZ181	100%
<i>Enterobacter aerogenes</i> cepa EA49 plásmido pEA49KPC	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PA121617 plásmido pBM413	100%
<i>Proteus mirabilis</i> strain AOUC001	100%
<i>Escherichia coli</i> cepa 06K2206 plásmido LM6771	100%
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Worthington plásmido pB1016	100%
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Thompson, plásmido pB1015	100%
<i>Klebsiella michiganensis</i> E718 plásmido pKOX_R1	100%
<i>Providencia stuartii</i> plásmido pMR0211	100%
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B cepa SC01 plásmido pXD1	100%
<i>Enterobacter cloacae</i> cepa S440	100%
<i>Serratia marcescens</i> plásmido pKSMA0710	100%
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Stanley cepa AM04864	100%
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Oranienburg	100%
<i>Leclercia adecarboxylata</i> cepa pP10164 plásmido pP101642	99%

7. Discusión

La salmonelosis es una enfermedad que afecta a los humanos y animales domésticos y silvestres. En el hombre se estiman 93.8 millones de casos a nivel mundial, y 80.3 millones (85.6%) asociados a alimentos de origen animal contaminados por este microorganismo, con un estimado de muertes de 155 mil anualmente (13). Además del impacto en la Salud Pública, este microorganismo afecta a la salud de los animales y económicamente a los sistemas ganaderos. El tratamiento para este microorganismo puede ser inefectivo debido a la resistencia a los antimicrobianos, en particular la asociada a las MTasas de 16S ARNr, lo que genera un escenario poco favorable para la salud del hombre, así como para la industria alimenticia. El objetivo de este trabajo fue la identificación de los genes de resistencia *armA*, *rmtB* y *rmtC*, que están asociados con MTasas de 16S ARNr, en cepas de *S. enterica* provenientes de bovinos.

Los serotipos que se identificaron en este trabajo fueron Typhimurium, Newport, Kentucky, Muenchen, Montevideo y Gallinarum. Estos serotipos son comúnmente aislados de bovinos con diversos usos zootécnicos y distintos estados de salud alrededor del mundo (76-78), con la excepción del serotipo Gallinarum que raramente es encontrado en bovinos (76).

El serotipo identificado con mayor frecuencia en el presente trabajo fue *S. Typhimurium*, el cual se ha descrito en cepas provenientes de muestras fecales de bovinos en Estados Unidos, México y otros países (76-79). Por otro lado, este serotipo se encuentra entre los cuatro serotipos de *Salmonella* (Enteritidis, Typhimurium, Newport y Heidelberg) asociados a enfermedades causadas por alimentos en Estados Unidos (80). Asimismo, varios autores reportan a *S.*

Typhimurium asociado a animales sanos y enfermos, en cortes cárnicos provenientes de cerdos, bovinos, aves, así como en melones, chiles, jamón, salchichas, chorizo, productos derivados de la leche y huevos (78, 80-86).

También se ha determinado que *S. Typhimurium* presenta una mayor diversidad de perfiles de resistencia a antimicrobianos, en comparación con otros serotipos presentes en bovinos y humanos. Uno de los patrones de resistencia que ha sido descrito con frecuencia es AMP, CHL, STR, SXT, y TET, que está asociado con aislamientos que contienen el fagotipo DT104 en México, Europa, Estados Unidos y Canadá (87-92). En adición, este patrón de resistencia se ha descrito en aislamientos de *S. Agona*, *S. Paratyphi B*, *S. Albany*, *S. Meleagridis* y *S. Newport*. Este patrón de resistencia está codificado en la SGI (*Salmonella* Genomic Island), donde se localiza un integrón que tiene asociados un grupo de genes de resistencia para los antimicrobianos antes mencionados (92-93).

Una técnica relativamente nueva ha sido propuesta para identificar los serotipos de *Salmonella*, así como para definir grupos de este género y llevar a cabo estudios de epidemiología molecular de forma global o mundial. La técnica es llamada Tipificación por secuencias multilocus (por sus siglas en inglés, MLST), donde a cada serotipo se les asigna una Secuencia Tipo (ST) (94). Algunos de los aislamientos usados en este trabajo ya fueron tipificados por esta técnica (95). El serotipo *S. Typhimurium* se encuentra principalmente en la ST19, y es el ST donde se ubican los aislamientos del serotipo Typhimurium reportados en el presente trabajo.

En trabajos en los que se han aislado cepas de *Salmonella* a partir de muestras de bovinos, en Irlanda, McEvoy *et.al.* observaron al serotipo Dublin en un 72% de las

muestras y los serotipos Agona y Typhimurium con 14% de las muestras en cada uno. El patrón de resistencia encontrado en el serotipo Typhimurium en este trabajo es similar al encontrado al de las cepas de *S. Typhimurium* DT104 (96).

Fegan *et.al.*, reportaron que a partir de aislamientos de bovino los serotipos con mayor frecuencia fueron el serotipo *S. Typhimurium* con un 62%, *S. Orion* y *S. Arberdeen* con 14% y *S. Anatum*, *S. Give*, *S. Muenchen*, y *S. Seftenberg* con 4.76%. El 76% del total de aislamientos fueron pansusceptibles, cuatro aislamientos del serotipo Typhimurium y uno del serotipo Give resultaron ser resistentes a uno o más antimicrobianos (97).

En este sentido, Afema *et.al.* mencionan que, en bovinos, los serotipos con mayor frecuencia de aislamiento son *S. Montevideo* con 20.4%, *S. Typhimurium* con 14%, *S. Newport* con 10.8% y *S. Dublin* con 7.5%. *S. Typhimurium* presentó resistencia en el 94% de los aislamientos, y más del 50% resultó resistente a 6 o más antimicrobianos (98).

Otro de los serotipos de importancia en Salud Pública identificado en este trabajo fue *S. Newport*; este serotipo al igual que *S. Typhimurium*, ha sido asociado a enfermedades causadas por alimentos y se ha aislado en cortes de cerdo, res, aves, tomates, alfalfa, frijoles mung, sandía y mangos (99-102).

Recientemente se han encontrado cepas de *S. Newport* con patrones de resistencia a AMP, CHL, STR, TET, AUG, CEP, FOX, TIO y disminución de la susceptibilidad a AXO. Al presentar resistencia a tres o más grupos de antibióticos se considera multirresistente (MDR) (*S. Newport* MDR-AmpC). Además, algunas de estas cepas son resistentes a GEN, KAN, y SXT, generando así un panorama poco alentador en el tratamiento (103). Los bovinos han sido identificados como reservorio de *S.*

Newport MDR-AmpC, y este serotipo también se ha reportado en cerdos, caballos, perros y palomas (104).

Con respecto a *S. Kentucky*, este se ha asociado principalmente a aves y bovinos clínicamente sanos, reptiles, y el hombre (105). De este serotipo se han identificado tres ST. La ST152 se ha reportado en aves y bovinos clínicamente sanos y raramente en el hombre, además de presentar un perfil de susceptibilidad del tipo pansusceptible (106). La ST198 se ha encontrado en el hombre en brotes epidémicos, reportándose como MDR con un patrón de resistencia a Amoxicilina (AMX), STR, SPE, GEN, SXT, TET, CIP, y NAL (104). Por último, la ST314 se ha recuperado de muestras de moluscos y carne de res y al igual que la ST152 es pansusceptible (107). La muestra identificada en este trabajo, fue identificada por MLST, lo que confirmó el serotipo como Kentucky y perteneciente a la ST198, pero el patrón de resistencia encontrado en nuestros aislamientos solo es similar con la resistencia a la GEN.

Salmonella Muenchen ha sido reportada en una gran variedad de hospederos, principalmente en animales domésticos, reptiles, fauna silvestre y alimentos (108-110). Los ST asociados a animales de *S. Muenchen* son los siguientes: ST82 reportado en bovinos y aves, el ST83 en cerdos y cocodrilos y los ST84 y 111 solo en humanos. La ST más diversa es la 112, ya que se ha aislado en animales como cerdos, bovinos, equinos, langostas, aves, reptiles, fauna silvestre, alimentos y el hombre (108, 111). Algunos de los aislamientos de *S. Muenchen* encontrados en cerdos presentaron multirresistencia, encontrando patrones muy parecidos a los de *S. Typhimurium* DT104 y *S. Newport* MDR-AmpC, con un patrón AMP, CHL, STR, SXT, TET, AUG, KAN; y AMP, CHL, STR, SMX, TET, AUG, KAN y CIP (107). Los

aislamientos de *S. Muenchen* reportados en otras especies raramente presentan multirresistencia (110). Al comparar los patrones de resistencia entre los reportados previamente y el encontrado en el presente trabajo encontramos que solo existen similitudes en la resistencia en aminoglucósidos del grupo 2-DOS 4,6, ya que en la presente tesis no se utilizó KAN, solo AMI, GEN y TOB.

S. Montevideo es uno de los dos serotipos aislados con mayor frecuencia en bovinos productores de carne, pero también se ha encontrado en diferentes hospederos. Por medio de MLST se han clasificado los aislamientos de *S. Montevideo*; la ST4 se ha aislado en el hombre, aves, reptiles, medio ambiente, bovinos, alimentos, perros, cerdos, jabalís y camarones y la ST81 se ha localizado en anfibios, hombre, bovino, cerdo y reptiles (108,104). Con respecto a la resistencia antibacteriana, Webb *et al.* reportaron que, de 101 aislamientos de este serotipo, 24 aislamientos (6.38%) presentaron resistencia a uno o más antimicrobianos, y 77 aislamientos (93.61%) resultaron ser pansusceptibles (112). De igual forma Bosilevac *et al.* determinaron que, de 36 aislamientos correspondientes a *S. Montevideo*, la mayoría resultaron ser pansusceptibles, encontrando que solo algunos aislamientos tuvieron resistencia a tetraciclina (109). Del mismo modo Afema *et al.* confirmaron que los aislamientos de este serotipo son mayormente pansusceptibles si provienen de bovinos (98).

El serotipo *S. Gallinarum* se ha reportado restringido a un hospedero, pero se ha encontrado escasamente en bovinos como un hospedero accidental (76). Para probar la sobrevivencia de este serotipo en hospederos como bovinos, Paulin *et al.* infectaron de forma experimental a becerros, comparándolos con otros serotipos como Typhimurium, Dublin, Cholerasuis y Abortusovis, en diferentes estados de la

patogenia: colonización e invasión intestinal, inducción de la respuesta enteropatogénica, translocación al torrente sanguíneo, y sobrevivencia en los intestinos y en torrente sanguíneo. En este estudio solo se recuperó *S. Gallinarum* a partir de medios de enriquecimiento sembrados con muestras de linfonodos, mucosa del intestino y contenido ruminal además de la mucosa. La habilidad de translocarse del epitelio intestinal al linfonodo regional fue comparada con el serotipo Dublín, que es un agente causal de enfermedad sistémica en bovinos, observando que *S. Gallinarum* fue localizado en menor concentración. Del mismo modo, la persistencia de los serotipos Dublín y *Gallinarum* en torrente sanguíneo fue evaluada por la inoculación I.V. posterior a 7 días. Los resultados de estos experimentos sugieren que *S. Gallinarum* es capaz de invadir el epitelio de la mucosa intestinal y translocarse, pero no es capaz de persistir sistémicamente en el torrente sanguíneo y esto se relaciona con su baja virulencia en becerros (113). Una de las causas más probables de encontrar *S. Gallinarum* en un bovino es debido a la ingestión de pollinaza o gallinaza, que son subproductos de las aves, y que son utilizados como una fuente de nitrógeno no proteico utilizado para complementar la alimentación de los bovinos (114). La contaminación de estos sub productos sería causada por el empleo de las excretas de aves que no estén libres de *Salmonella*, así como un tratamiento térmico inadecuado (usar una temperatura inadecuada y no darle el tiempo suficiente para eliminar a los microorganismos). Este tratamiento es indispensable para utilizar las excretas de las aves en alimentación de bovinos (115-116). Las causas anteriores podrían explicar el origen de la muestra contaminada con *S. Gallinarum*.

En el presente trabajo se encontró que el 100% de las cepas tuvo resistencia a GEN, AMI y TOB. Además, en estas cepas encontramos resistencia en un 100% a CFZ, y algunas cepas resultaron resistentes o intermedias a algunos beta-lactámicos e inhibidores de beta-lactamasas y otros antimicrobianos como AMP (R=6), AUG (I=1), AMS (R=1, I=1), CAZ (R=1), AXO (R=1), NIT (I=13, R=2), y SXT (R=2).

Con respecto a los patrones de resistencia reportados a nivel mundial se ha observado que los antimicrobianos con mayor resistencia en cepas de *S. enterica* provenientes de bovinos son TET, STR, sulfisoxazol (SXZ), NAL, SXT, AMX, CHL, FOX, TIO, AUG, FLO, CEF, GEN, KAN, AMI, AXO y CIP (76-79, 87-89, 116-118). Los patrones de resistencia de las cepas *S. enterica* aisladas en este trabajo, no presentan similitud a los reportes anteriores, ya que no se encontró resistencia a sulfas, quinolonas, tetraciclina y cloranfenicol.

Los genes de las MTasas de 16S ARNr se encuentran distribuidos mundialmente, pero son relativamente escasos, y son más frecuentes en países asiáticos que en países de Europa y América (45,119). Estos genes han sido identificados en bacterias gram negativas provenientes de humanos como *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *C. freundii*, *C. amalonaticus*, *S. marcescens* y *M. morgani*, asimismo se ha observado que es más frecuente el gen *armA*, seguido de *rmtB*. Además, se ha observado la asociación de los genes de MTasas de 16S ARNr con genes de beta-lactamasas como CTX-M, TEM, PER, SHV, y NDM (120-127). En cepas provenientes de animales se ha encontrado frecuentemente al gen *rmtB* (principalmente en China, en aves y cerdos) seguido de *armA* y *rmtC*. Los aislamientos provenientes de

animales en los que se han encontrado estos genes son *E. coli* y *S. enterica* principalmente, y en menor proporción *K. pneumoniae*, *M. morganii*, *P. mirabilis*, *L. adecarboxylata*, *E. aerogenes* y *E. cloacae*. Estos genes también presentan asociación con beta-lactamasas como CTX-M, TEM y CMY (56-69).

En México, se ha reportado la presencia del gen de resistencia *rmtB*, en aislamientos de *E. cloacae* y *K. pneumoniae*, provenientes de pacientes humanos (127), pero nunca de cepas provenientes de animales.

En nuestro trabajo se encontró que el gen *armA* tiene una frecuencia de 6.45%, otros autores como Yamanae *et.al.*, reportan la presencia de estos genes en 26 de 87,626 (0.03%) aislamientos clínicos (que incluyen a *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, y *Enterobacter aerogenes*) en el año 2004. En este estudio el gen más frecuente fue *rmtA*, seguido de *armA*, *rmtC*, y *rmtB* (120), mientras que en un estudio similar realizado por Yu *et.al.*, determinaron que en aislamientos de *E. coli* presentaron una frecuencia de 5.44% (128). Por otro lado, Park *et al.* en 2006, reportaron que en cepas de *E. cloacae*, *C. freundii* y *S. marcescens*, aisladas de muestras clínicas en 2003 en Corea, identificaron a *armA* (46 de 413 (11.13%)) y *rmtB* (1 de 413 (0.24%)) (121).

La frecuencia de las MTasas de 16S ARNr en otros países, de acuerdo con el SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) en la región de Asia-Pacífico, en los años 2007 a 2008 fue la siguiente: 10.5% en India, 6.9% en China, 6.1% en Korea, 5% en Taiwán y 3.1% in Hong Kong (119). En sudamérica, Livermore *et al.* en 2010, reportaron que en cepas de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii*, *M. morganii*, y *Enterobacter* spp., recolectadas en Reino unido, en los años 2006-2009, el gen con mayor prevalencia fue *armA* (8/87 (9.19%)), seguido de *rmtC* (7/87 (8.04%)) (122).

Tijet *et.al.* en 2007, determinaron que 7 de 1064 (0.64%) muestras de enterobacterias (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morgani*, y *P. mirabilis*) colectadas en Argentina resultaron positivas al gen *rmtD2* (50).

En animales se han encontrado prevalencias más altas como las reportadas por Liu *et. al.*, en aislamientos provenientes de cerdos (31.87%) (60). Otros autores como Deng *et. al.*, encontraron prevalencias menores en animales de compañía, 27.34% (61). Du *et.al.*, reportan en aves una prevalencia de 7.79% (64).

La prevalencia de este trabajo es muy similar a la reportada en aislamientos procedentes de animales. Es necesario monitorear la frecuencia de estos genes de resistencia para conocer dónde se encuentran, las vías de transmisión y los reservorios, con la finalidad de evitar la presencia de brotes en animales y humanos.

8. Conclusiones

En este trabajo se identificaron por métodos fenotípicos, serológicos y moleculares aislamientos de *S. enterica* procedentes de bovinos de carne. El principal serotipo identificado fue *S. Typhimurium*, así como otros serotipos como *S. Montevideo*, *S. Muenchen*, *S. Gallinarum*, *S. Kentucky* y *S. Newport*, y dos aislamientos que no fueron identificados, y que presentaron la fórmula antigénica: O4, 5; g, p s. Asimismo, el 100% de los aislamientos fue resistente a gentamicina, tobramicina, amikacina, y cefazolina.

Este es el primer trabajo en México donde se identificó al gen *armA* (metiltransferasas de 16S ARNr) en un aislamiento de *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Typhimurium, procedentes de bovinos productores de carne.

Los genes *rmtB* y *rmtC* no se encontraron en las muestras trabajadas en la presente tesis.

9. Bibliografía

- 1.- Wray C. Wray A. (Editores) *Salmonella* in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Reino Unido, 2003
- 2.- Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt, E. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. 2006 Springer Science+Business Media, LLC. Pag 130.
- 3.- Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. Bergey's Manual of systematic bacteriology second edition, Volume two, The *Proteobacteria*, Part B: The *Gammaproteobacteria*. Springer. 2005, pages 764-765.
- 4.- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. Int J Syst Evol Microbiol 2005;55:519-20.
- 5.- Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol 2005;55:521-4.
- 6.- Sylvie Issenhuth-Jeanjean, Roggentin P, Mikoleit M, Martine, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol 2014 Sep;165(7):526-30
- 7.- Coetzer JA, Thomson GR, Tustin RC. Disease of livestock Volume 2: Oxford University Press. 1994
- 8.- Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE. Review: Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol*

Infect 2000;125:229-255.

9.- National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS), United States Department of Agriculture (USDA). 2011 NARMS Animal Antimicrobial Resistance Annual Report. Athens, GA: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2014

10.- La Ragione R, Metcalfe HJ, Villarreal-Ramos B, Werling D. *Salmonella* infections in Cattle. En: Barrow PA, Methner U. *Salmonella in domestic animals* 2da Edición. CABI International 2013

11.- Castro RF. Epizootiología de la Salmonelosis en Bovinos, Porcinos y Aves. *Ciencia Veterinaria* 1981;3:148-171.

12.- Organización mundial de la salud. Fact Sheet: *Salmonella* (non-typhoidal). [homepage on the Internet]. c20108 [Actualizado enero 23 2018; citado:15 marzo 2018]. Disponible desde <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>

13.- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM; International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 2010; Mar 15;50 (6):882-9.

14.- OIE, OIE Collaborative Centre on Veterinary Medicinal Products. OIE International Standards on Antimicrobial Resistance 2003. Organización mundial de la sanidad animal [En línea]. [Citado 2017 abril 26].

15.- Lathers CM. Role of veterinary medicine in public health: antibiotic use in food animals and humans and the effect on evolution of antibacterial resistance. *J Clin Pharmacol* 2001 Jun;41(6):595-9

- 16.-Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010 Sep; 74(3): 417–433.
- 17.- Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004 Dec;10(12 Suppl): S122-9.
- 18.- Andersson DI, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:465–478.
- 19.- Courvalin P. The Garrod Lecture. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:855-869.
- 20.- Benveniste R, Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2276–2280.
- 21.- Cundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Ann Rev Microbiol* 1989;43:207-233
- 22.- von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk J, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolffs PFG. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* 2016;7:173.
- 23.- Davison J. Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid*. 1999 Sep;42(2):73-91.
- 24.- Tamminen M, Virta M, Fani R, Fondi M. Large-scale analysis of plasmid relationships through gene-sharing networks. *Mol Biol Evol* 2012;4:1225-40.
- 25.- Summers AO. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin Infect Dis* 2002;34:85-92.

- 26.- Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol* 2011;6: 653-66
- 27.-Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;70:140-150
- 28.- Benveniste R, Davies J. Structure-Activity Relationships Among the Aminoglycoside Antibiotics: Role of Hydroxyl and Amino Groups. *Antimicrob Agents Chemother* 1973;4(4):402–409.
- 29.-Hidalgo del Río L. Identificación y caracterización de un mecanismo emergente de resistencia a aminoglucosidos las metiltransferasas de 16S. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal. Tesis Doctoral. Madrid, España, 2014.
- 30.- Karimi R, Ehrenberg M. Dissociation rate of cognate peptidyl-tRNA from the A-site of hyper-accurate and error-prone ribosomes. *Eur J Biochem* 1994 Dec 1;226(2):355-60
- 31.- Pape T, Wintermeyer W, Rodnina M. Conformational switch in the decoding region of 16s rRNA during aminoacyl-tRNA selection of the ribosome. *Nat Struct Biol* 2000;7:104-107.
- 32.- Busse HJ, Wöstmann C, Bakker EP. The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. *J Gen Microbiol* 1992 Mar;138(3):551-61.

- 33.- Yoneyama H, Sato K, Nakae T. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to outer membrane stabilization. *Chemotherapy* 1991;37(4):239-45.
- 34.- Bakker EP. Aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics: hygromycin B is an atypical bactericidal compound that exerts effects on cells of *Escherichia coli* characteristics for bacteriostatic aminocyclitols. *J Gen Microbiol* 1992;138 (3):563-9.
- 35.- Davis DB. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* 1987 Sep;51(3):341–350.
- 36.- Mcehta R, Champney WS. 30S Ribosomal Subunit Assembly Is a Target for Inhibition by Aminoglycosides in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 May;46(5):1546–1549.
- 37.- Ramirez MS, Tomalsky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 2010 December;13(6):151–171.
- 38.-Westbrock-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warrener P, Nguyen LY, Shawar RM, Folger KR, Stover CK. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Dec;43(12):2975-83.
- 39.- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. *Clin Infect Dis* 2002 Mar 1;34(5):634-40.
- 40.- Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 2005 Feb;105(2):477-98.
- 41.- Doi Y, Arakawa Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007 Jul 1;45(1):88-94.

- 42.- Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2565–71.
- 43.- Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003 362:1888–93.
- 44.- Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* 2012 Jun;15(3):133-48.
- 45.- Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016 Jun;30(2):523-37.
- 46.- Gołbiewski M, Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Zylinska J, Baraniak A, Gniadkowski M, Bardowski J, Cegłowski P. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*CTX-M-3. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(11):3789-95.
- 47.- Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(2):491-6.
- 48.- Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase, RmtC,

found in a *Proteus mirabilis* Isolate Demonstrating Extraordinary High-Level Resistance against Various Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1):178–184.

49.- Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(3):852-6.

50.- Tijet, N, Andres P, Chung C, Lucero C, Low DE, Galas M, Corso A, Petroni A, Melano RG. rmtD2, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in *Enterobacteriaceae* isolates from Argentina for more than a decade *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:904-909

51.- Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(6):2666-9

52.- Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Jul;56(7):3960-2.

53.- Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 May;57(5):2397-400

- 54.- O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, Doi Y. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 May;57(5):2413-6
- 55.- Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Dec;51(12):4401-9.
- 56.- González-Zorn B, Teshager T, Casas M, Porrero MC, Moreno MA, Courvalin P, Domínguez L. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2005 Jun;11(6):954-6.
- 57.- Deng Y, Zeng Z, Chen S, He L, Liu Y, Wu C, Chen Z, Yao Q, Hou J, Yang T, Liu JH. Dissemination of IncFII plasmids carrying *rmtB* and *qepA* in *Escherichia coli* from pigs, farm workers and the environment. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1740–1745.
- 58.- Choi MJ, Lim SK, Nam HM, Kim, AR, Jung SC, Kim MN. Apramycin and gentamicin resistances in indicator and clinical *Escherichia coli* isolates from farm animals in Korea. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8:119–123.
- 59.- Chen L, Chen ZL, Liu JH, Zeng Z., Ma JY, Jiang HX. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:880–885.

- 60.- Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, Chen ZL. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6 '-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2992–2993.
- 61.- Deng Y, He L, Chen S, Zheng H, Zeng Z, Liu Y, Sun Y, Ma J, Chen Z, Liu JH. F33:A-B- and F2:A-B- plasmids mediate dissemination of *rmtB-bla CTX-M-9* group genes and *rmtB-qepA* in *Enterobacteriaceae* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4926–4929.
- 62.- Xia LN, Tao XQ, Shen JZ, Dai L, Wang Y, Chen X, Wu CM. A survey of β -lactamase and 16S rRNA methylase genes among fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates and their horizontal transmission in Shandong, China. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8:1241–1248.
- 63.- Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, Gonzalez-Zorn B. 16S rRNA methyltransferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Emerg Infect Dis* 2010;16:712–715.
- 64.- Du XD, Wu CM, Liu HB, Li XS, Beier RC, Xiao F, Qin SS, Huang SY, Shen JZ. Plasmid-mediated ArmA and RmtB 16S rRNA methylases in *Escherichia coli* isolated from chickens. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(6):1328–1330.
- 65.- Granier, SA, Hidalgo L, San Millan A, Escudero JA, Gutierrez B, Brisabois A, Gonzalez-Zorn B, 2011. ArmA methyltransferase in a monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(11):5262-6.

- 66.- Li DX, Zhang SM, Hu GZ, Wang Y, Liu HB, Wu CM, Shang YH, Chen YX, Du XD, 2012. Tn3-associated *rmtB* together with *qnrS1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla CTX-M-15* are co-located on an F49:A-B- plasmid in an *Escherichia coli* ST10 strain in China. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(1):236-8
- 67.- Du XD, Li DX, Hu GZ, Wang Y, Shang YH, Wu CM, Liu HB, Li XS. Tn1548-associated *armA* is co-located with *qnrB2*, *aac(6')-Ib-cr* and *blaCTX-M-3* on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(1):246-8.
- 68.- Yao Q, Zeng Z, Hou J, Deng Y, He L, Tian W, Zheng H, Chen Z, Liu JH. Dissemination of the *rmtB* gene carried on IncF and IncN plasmids among *Enterobacteriaceae* in a pig farm and its environment. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(11):2475-9.
- 69.- Lee H, Yong D, Yum JH, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:305–12.
- 70.- McGann P, Chahine S, Okafor D, Ong AC, Maybank R, Kwak YI, Wilson K, Zapor M, Lesho E, Hinkle M. Detecting 16S rRNA Methyltransferases in *Enterobacteriaceae* by Use of Arbekacin. *J Clin Microbiol* 2016 Jan;54(1):208-11.
- 71.- Hu X, Xu B, Yang Y, Liu D, Yang M, Wang J, Shen H, Zhou X, Ma X. A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside-resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *BMC Microbiol* 2013 Mar 14;13:58.

72.- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

73.- Spicer, C. C. A quick method of identifying *Salmonella* H antigens. *J Clin Pathol* 1956;9:378-379.

74.- Edwards, P. R. Serologic examination of *Salmonella* cultures for epidemiologic purposes. Public Health Service Publication. National Communicable Disease Center, Atlanta, Ga. 1962.

75.- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by Polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* 1992 Aug;6(4):271-9.

76.- Kidanemariam A, Engelbrecht M, Picard J. Retrospective study on the incidence of *Salmonella* isolations in animals in South Africa, 1996 to 2006. *J S Afr Vet Assoc* 2010 Mar;81(1):37-44.

77.- Tadesse Eguale, Ephrem Engidawork, Wondwossen A. Gebreyes, Daniel Asrat, Haile Alemayehu, Girmay Medhin, Roger P. Johnson, John S. Gunn. Fecal prevalence, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Salmonellae* in dairy cattle in central Ethiopia. *BMC Microbiol* 2016;16: 20.

78.- Alexander KA, Warnick LD, Wiedmann M. Antimicrobial resistant *Salmonella* in dairy cattle in the United States. *Vet Res Commun* 2009;33:191–209.

- 79 Oloya J, Theis M, Doetkott D, Dyer N, Gibbs P, Khaita ML. Evaluation of *Salmonella* Occurrence in Domestic Animals and Humans in North Dakota (2000–2005). *Foodborne Pathog Dis* 2007 Winter;4(4):551-63.
- 80.- Jackson BR, Griffin PM, Cole D, Walsh KA, Chai SJ. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food Commodities, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis* 2013 Aug;19(8):1239-44.
- 81.- Gallegos-Robles MA, Morales-Loredo A, Alvarez-Ojeda G, Vega-P A, Chew-M Y, Velarde S, Fratamico P. Identification of *Salmonella* Serotypes Isolated from Cantaloupe and Chile Pepper Production Systems in Mexico by PCR—Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Food Prot* 2008 Nov;71(11):2217-22.
- 82.-Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Publica Mex* 2000;42:490-495.
- 83.- S. Villalpando-Guzmán, C. R. Vázquez Quiñones, I. Natividad-Bonifacio, E. I. Quiñones-Ramírez and C. Vázquez-Salinas. Prevalence of *Salmonella* in Chicken, Beef and Pork Meat in Mexico City. *Acad J Microbiol Res* 2016;4(10):125-130.
- 84.- Moffatt CR, Musto J, Pingault N, Miller M, Stafford R, Gregory J, Polkinghorne BG, Kirk MD. *Salmonella* Typhimurium and Outbreaks of Egg-Associated Disease in Australia, 2001 to 2011. *Foodborne Pathog Dis* 2016 Jul;13(7):379-85.
- 85.- K Nygård, Lindstedt BA, Wahl W, Jensvoll L, Kjelsø C, Mølbak K, Torpdahl M, Kapperud G. Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to imported cured sausage using MLVA-subtyping. *Euro Surveill* 2007 Mar 15;12(3):E070315.5

- 86.- CDC. *Salmonella* Typhimurium infection associated with raw milk and cheese consumption--Pennsylvania, 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2007 Nov 9;56(44):1161-4.
- 87.- Zaidi MB, McDermott PF, Fedorka-Cray P, Leon V, Canche C, Hubert SK, Abbott J, León M, Zhao S, Headrick M, Tollefson L. Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. Clin Infect Dis 2006 Jan 1;42(1):21-8.
- 88.- Zaidi MB, Zaidi, Juan Jose Calva, Maria Teresa Estrada-Garcia, Veronica Leon, Gabriela Vazquez, Gloria Figueroa, Estela Lopez, Jesus Contreras, Jason Abbott, Shaohua Zhao, Patrick McDermott, Linda Tollefson. Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. Emerg Infect Dis 2008 Mar; 14(3):429-35.
- 89.- Perez-Montaña JA, Gonzalez-Aguilar D, Barba J, Pacheco-Gallardo C, Campos-Bravo CA, Garcia S, Heredia NL, Cabrera-Diaz E. Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. J Food Prot 2012 May;75(5):867-73.
- 90.- E. John Threlfall. Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104—a truly international multiresistant clone. J Antimicrob Chemother 2000 Jul;46(1):7-10.
- 91.- Poppe C, Smart N, Khakhria R, Johnson W, Spika J, Prescott J. *Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. Can Vet J 1998 Sep;39(9):559-65.

- 92.- Bhunia, A.K. Capitulo: *Salmonella enterica*, en Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. Springer, pp 201-216. 2008
- 93.- Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckert A. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. Mol Microbiol 2005 Mar;55(6):1911-24.
- 94.- Atchman M, Wain J, Weil X, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S, S Enterica MLST Study group. Multilocus sequence typing as replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PloS Pathog 2012;8(8):e1002776.
- 95.- Lopez Diaz Annia Denisse. Genotipificacion de cepas de *Salmonella* spp. provenientes de bovinos. Tesis de Maestria. FMVZ-UNAM. 2017.
- 96.- McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. J Appl Microbiol 2003;94(4):693-700.
- 97.-Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. Quantification and prevalence of *Salmonella* in beef cattle presenting at slaughter. J Appl Microbiol 2004;97(5):892-8.
- 98.- Afema JA, Mather AE, Sisco WM. Antimicrobial Resistance Profiles and Diversity in *Salmonella* from Humans and Cattle, 2004-2011. Zoonoses Public Health 2015 Nov;62(7):506-17
- 99.- Van Beneden CA, Keene WE, Strang RA, Werker DH, King AS, Mahon B, Hedberg K, Bell A, Kelly MT, Balan VK, Mac Kenzie WR, Fleming D. Multinational

outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infections due to contaminated alfalfa sprouts. JAMA 1999;281(2):158-62.

100.- Bayer C, Bernard H, Prager R, Rabsch W, Hiller P, Malorny B, Pfefferkorn B, Frank C, de Jong A, Friesema I, Stark K, Rosner B. An outbreak of *Salmonella* Newport associated with mung bean sprouts in Germany and the Netherlands, October to November 2011. Euro Surveill 2014 Ene 9;19(1).

101.- Public Health England. Outbreak of *Salmonella* Newport. Con acceso el 22 de marzo del 2018. Disponible desde:

<http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714094427/http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2012PressReleases/120202SalmonellaNewportoutbreak/>

102.- Sivapalasingam S, Barrett E, Kimura A, Van Duyne S, De Witt W, Ying M, et al., authors. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport infection linked to mango consumption: impact of water-dip disinfestation technology. Clin Infect Dis 2003;37:1585–90.

103.- Zhao S, Qaiyumi S, Friedman S, Singh R, Foley SL, White DG, McDermott PF, Donkar T, Bolin C, Munro S, Baron EJ, Walker RD. Characterization of *Salmonella enterica* serotype newport isolated from humans and food animals. J Clin Microbiol 2003 Dec;41(12):5366-71.

104.- Rankin SC, Aceto H, Cassidy J, Holt J, Young S, Love B, Tewari D, Munro DS, Benson CE. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella*

enterica serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. J Clin Microbiol 2002 Dec;40(12):4679-84.

105.- Haley BJ, Kim SW, Pettengill J, Luo Y, Karns JS, Van Kessel JA. Genomic and Evolutionary Analysis of Two *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Sequence Types Isolated from Bovine and Poultry Sources in North America. PLoS One 2016 Oct 3;11(10):e0161225.

106.- Haley BJ, Kim SW, Liljebjelke K, Guard J, Van Kessel JA. Genome Sequences of Two *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Isolates Recovered from Poultry Carcasses in the United States Genome Announc. 2016 Nov 17;4(6). pii: e01289-16.

107.- Murgia M, Bouchrif B, Timinouni M, Al-Qahtani A, Al-Ahdal MN, Cappuccinelli P, Rubino S, Paglietti B. Antibiotic resistance determinants and genetic analysis of *Salmonella enterica* isolated from food in Morocco. Int J Food Microbiol 2015 Dec 23;215:31-9.

108.- Achtman M, Hale J, Murphy RA, Boyd EF, Porwollik S. Population structures in the SARA and SARB reference collections of *Salmonella enterica* according to MLST, MLEE and microarray hybridization. Infect Genet Evol 2013 Jun;16:314-25.

109.- Bosilevac JM, Guerini MN, Kalchayanand N, Koohmaraie M. Prevalence and characterization of *Salmonellae* in commercial ground beef in the United States. Appl Environ Microbiol 2009 Apr;75(7):1892-900.

110.- Gebreyes WA, Thakur S. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Feb;49(2):503-11.

111.- EnteroBase. [online] Enterobase.warwick. Disponible desde: <http://enterobase.warwick.ac.uk> [Con acceso el 7 febrero 2018].

112.- Webb HE, Brichta-Harhay DM, Brashears MM, Nightingale KK, Arthur TM, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Schmidt JW, Wang R, Granier SA, Brown TR, Edrington TS, Shackelford SD, Wheeler TL, Loneragan GH. *Salmonella* in Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle at Slaughter. *Front Microbiol* 2017 Nov 9;8:2214.

113.- Paulin SM, Watson PR, Benmore AR, Stevens MP, Jones PW, Villarreal-Ramos B, Wallis TS. Analysis of *Salmonella enterica* serotype-host specificity in calves: avirulence of serotype gallinarum correlates with bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence in vivo. *Infect Immun* 2002 Dec;70(12):6788-97.

114.- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-013-ZOO-1996, Tratamiento, transporte, movilización, uso, almacenamiento y comercialización de la gallinaza y pollinaza. DOF: 20/03/1996

115.- Jinkyung Kim, Junshu Diao, Marion W. Shepherd, Jr., Randhir Singh, Spencer D. Heringa, Chao Gong, and Xiuping Jiang. Validating Thermal Inactivation of

Salmonella spp. in Fresh and Aged Chicken Litter. Appl Environ Microbiol 2012 Feb; 78(4):1302–1307.

116.- Dargatz DA, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Koprak CA, Ferris KE, Headrick ML. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolates from US cattle in feedlots in 1999 and 2000. J Appl Microbiol 2003;95(4):753-61.

117.- Sara E., Guy H. Loneragan, Kendra K. Nightingale, Dayna M. Brichta-Harhay, Henry Ruiz, Jacob R. Elder, Lyda G. Garcia, Markus F. Miller, Alejandro Echeverry, Rosa G. Ramírez Porras, Mindy M. Brashears. Substantial within-Animal Diversity of *Salmonella* Isolates from Lymph Nodes, Feces, and Hides of Cattle at Slaughter. Appl Environ Microbiol 2013 Aug;79(15):4744–4750.

118.- Martínez-Chávez L, Cabrera-Díaz E, Pérez-Montaña JA, Garay-Martínez LE, Varela-Hernández JJ, Castillo A, Lucía L, Ávila-Novoa MG, Cardona-López MA, Gutiérrez-González P, Martínez-González NE. Quantitative distribution of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on beef carcasses and raw beef at retail establishments. Int J Food Microbiol 2015 Oct 1; 210:149-55.

119.- Bell JM, Andersson P, Jones R *et al.* 16S rRNA methylase containing *Enterobacteriaceae* in the SENTRY Asia-Pacific region frequently harbour plasmid-mediated quinolone resistance and CTXM types. In: Abstracts of the Twentieth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, 2010. Abstract O559.

- 120.- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Kimura K, Kai K, Ishikawa S, Ozawa Y, Konda T, Arakawa Y. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis* 2007 Apr;13(4):642-6.
- 121.- Park YJ, Lee S, Yu JK, Woo GJ, Lee K, Arakawa Y. Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum beta-lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2006 Oct;58(4):907-8.
- 122.- Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, Woodford N. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2011 Sep;66(9):2002-5.
- 123.- Berçot B, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Dec;52(12):4526-7.
- 124.- Berçot B, Poirel L, Ozdamar M, Hakko E, Türkoglu S, Nordmann P. Low prevalence of 16S methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from a Turkish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2010 Apr;65(4):797-8.
- 125.- Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007 Mar;59(3):459-64.

126.- Sabtcheva S, Saga T, Kantardjiev T, Ivanova M, Ishii Y, Kaku M. Nosocomial spread of *armA*-mediated high-level aminoglycoside resistance in *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-3 beta-lactamase in a cancer hospital in Bulgaria. J Chemother 2008 Oct;20(5):593-9.

127.- Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. Antimicrob Agents Chemother 2008 May;52(5):1843-5.

128.- Yu FY, Yao D, Pan JY, Chen C, Qin ZQ, Parsons C, Yang LH, Li QQ, Zhang XQ, Qu D, Wang LX. High prevalence of plasmid-mediated 16S rRNA methylase gene *rmtB* among *Escherichia coli* clinical isolates from a Chinese teaching hospital. BMC Infect Dis 2010 Jun 23; 10:184.

10. Apéndice

10.1 Abreviaturas.

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
AMP	Ampicilina	2-DOS	2-desoxiestreptamina
AUG	Ampicilina con ácido clavulánico	2-DOS 4-6	Aminoglucosidos disustituidos 4-6
AMS	Ampicilina con sulbactam	2-DOS 4-5	Aminoglucosidos disustituidos 4-5
PTZ	Piperacilina con Tazobactam	ATP	Adenosin trifosfato
CFZ	Cefazolina	RND	
CAZ	Ceftazidima	EMA	Enzimas Modificadores de Aminoglucósidos
AXO	Ceftriaxona	AAC	Aminoglucósidos Acetiltransferasas
FEP	Cefepima	ANT	Aminoglucósidos Acetiltransferasas
IMI	Imipenem	APH	Aminoglucósidos Acetiltransferasas
MEM	Meropenem	MTasas 16S ARNr	Metiltransferasas de 16S ARNr
ERP	Ertapenem	g	gramo
AZT	Aztreonam	µg	Microgramos
FOS	Fosfomicina	ng	nanogramos
AMI	Amikacina	L	Litro
GEN	Gentamicina	mL	Mililitro
TOB	Tobramicina	Min	Minuto
TGC	Tigeciclina	S	Segundo
CIP	Ciprofloxacino	°C	Grados celsius
MXF	Moxifloxacino	arm	<i>aminoglycoside resistance methylase</i>
NOR	Norfloxacino	rmt	<i>rRNA methyltransferase</i>
CHL	Cloranfenicol	npm	<i>novel plasmid-mediated 16S rRNA N1-A1408 methyltransferase</i>
STR	Estreptomicina	TSA	Agar de tripticaseina de soya (<i>Trypticasein Soy Agar</i>)
TET	Tetraciclina	BHI	Caldo infusión cerebro corazón (<i>Brain Heart infusion</i>)

SPE	Espectinomicina	PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase chain reaction</i>)
SXT	Sulfametoxazol y Trimetoprim	mM	Milimolar
SXZ	Sulfisoxazol	μM	Micromolar
NIT	Nitrofurantoína	dNTP	Desoxinucleótido
pH	Potencial de Hidrógeno	Taq Polimerasa	Polimerasa obtenida del organismo <i>Thermus aquaticus</i>
Aw	Actividad de Agua	BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
Subsp.	Subespecie	CLSI	Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>)
CMI	Concentración mínima inhibitoria	MLST	Tipificación por secuencias multilocus. (<i>Multi Locus Sequence Type</i>)
LPS	Lipopolisacárido	SGI	Isla genómica de <i>Salmonella</i> (<i>Salmonella Genomic Island</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico	ST	Secuencia tipo (<i>Sequence Type</i>)
ARN	Ácido ribonucleico		
ARNm	ARN mensajero		
ARNt	ARN transferencia		
ARNr	ARN ribosomal		

10.2 Lista de cuadros.

Cuadro #	Título	Página
1	Serotipos en cada especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	3
2	Serotipos de <i>Salmonella</i> asociados a un hospedero específico y enfermedades	4
3	Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.	6
4	Clasificación general de los aminoglucósidos	9
5	Mecanismos de resistencia en contra de aminoglucósidos	12
6	Patrón de resistencia que confieren las diferentes MTasas de 16S ARNr	17
7	Aislamientos de bacterias gram negativas en las que se detectó la presencia de MTasas de 16S ARNr en animales de producción, mascotas o alimentos.	18
8	Aislamientos de <i>Salmonella</i> de bovinos.	23
9	Posibles resultados del sistema comercial Spicer-Edwards para la tipificación del antígeno flagelar.	29
10	Determinación del perfil de sensibilidad a los antimicrobianos en los aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.	35
11	Determinación de serotipos de los aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.	37
12	Homología en la secuencia obtenida del gen <i>armA</i> , comparada con la base de datos del GenBank.	40

10.3 Lista de figuras.

Figura #	Título	Página
1	Estructura química de los aminoglucósidos	8
2	Mecanismo de discriminación del sitio A entre los diferentes ARNt.	11
3	Distribución de los diferentes genes de MTasas de 16S ARNr	18
4	Medios utilizados para la serotipificación de <i>Salmonella</i>	26
5	Esquema identificación del antígeno somático de <i>Salmonella</i> por medio de la prueba de aglutinación.	27
6	Esquema identificación del antígeno flagelar de <i>Salmonella</i> por medio de la prueba de aglutinación utilizando el sistema comercial Spicer-Edwards.	29
7	Amplificación del gen <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> spp	36
8	Amplificación del gen de resistencia <i>armA</i>	38
9	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los aislamientos de <i>Salmonella</i> 142 y 523 con el gen <i>armA</i>	39