



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCION HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

**SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE  
*Salmonella enterica* DE ORIGEN ANIMAL Y ALIMENTARIO**



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

Tesis para ser presentada a la Dirección de Postgrado de la Universidad  
de Concepción

TANIA LORENA JUNOD LÓPEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2010

**SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Salmonella enterica*  
DE ORIGEN ANIMAL Y ALIMENTARIO**

Profesor Patrocinante

---

Juana Isabel López Martín.  
Profesor Asociado.  
Médico Veterinario,  
M. Sc.

Profesor Asesor Externo



---

Consuelo Borie Polanco  
Profesor Asociado.  
Médico Veterinario,  
M. Sc.

Profesor Asesor

---

Rubén Pérez Fernández  
Profesor Titular.  
Médico Veterinario,  
M. Sc.

Director (s) Programa Magíster  
en Ciencias Veterinarias

---

Mario Briones Luengo.  
Profesor Asistente,  
Médico Veterinario,  
M.Sc.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo		Página
I	RESUMEN	1
II	SUMMARY	2
III	INTRODUCCIÓN	3
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	22
V	RESULTADOS	26
VI	DISCUSIÓN	36
VII	CONCLUSIONES	49
VIII	REFERENCIAS	50
IX	ANEXOS	62



## ÍNDICE DE TABLAS

En el texto		
Tabla		Página
1	Antibióticos y concentraciones utilizadas para las pruebas de susceptibilidad de los aislados de <i>Salmonella enterica</i> .	24
2	Porcentaje de serovares de <i>S. enterica</i> según origen de la muestra.	26
3	Porcentaje de serovares de <i>Salmonella</i> resistentes (Método Kirby Bauer) según origen de aislamiento.	27
4	Distribución de cepas de <i>S. enterica</i> con resistencia a algún antibiótico según serovar y origen de aislamiento de acuerdo a método Kirby Bauer.	28
5	Número y porcentaje de serovares de <i>S. enterica</i> con MDR en relación a su origen de aislamiento.	30
6	Patrones de resistencia a múltiples drogas en serovares de <i>Salmonella</i> aislados entre junio de 2007 y junio de 2009 (Método Kirby Bauer).	31
7	Rangos de CMI <sub>50</sub> , CMI <sub>90</sub> y RIC en las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas (n=35).	34

## En el Anexo

Tabla		Página
A	Niveles de CMI de <i>Salmonella enterica</i> aisladas de alimentos y ambiente.	60
B	Niveles de CMI obtenidos de <i>Salmonella enterica</i> aisladas de bovinos y equinos	60
C	Niveles de CMI obtenidos de <i>Salmonella enterica</i> aisladas de gaviotas.	60
D	Niveles de CMI obtenidos de <i>Salmonella enterica</i> aisladas de cerdos.	61



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Número de cepas de <i>Salmonella</i> distribuidas según patrones de resistencia observados y serovares en que se presentó.	30
2	Relación entre susceptibilidad antibiótica y origen de las cepas de <i>Salmonella</i> . 0: susceptible; 1: resistente para cada uno de los antibióticos. Origen: 1: Alimentario; 2: Animal.	35



## **I.RESUMEN**

### **SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE ORIGEN ANIMAL Y ALIMENTARIO**

### **ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY IN STRAINS TO *Salmonella enterica* FROM ANIMAL AND FOOD**

La resistencia a uno o varios antimicrobianos en bacterias se ha extendido y es preocupante. Se analizaron aislados de *Salmonella enterica* de origen animal y de alimento provenientes del laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Universidad de Concepción, para determinar la susceptibilidad frente a antibióticos de uso en terapia humana y animal. Las muestras fueron aisladas de acuerdo a métodos microbiológicos tradicionales con protocolos estandarizados. La determinación de resistencias se realizó mediante método Kirby-Bauer y concentración mínima inhibitoria (CMI) siguiendo normas del CLSI. De las 68 cepas aisladas de origen animal y alimentario, se identificaron 9 serovares. Se encontraron cepas resistentes a uno o más antibióticos en el 54,68% de las cepas, con 11 patrones diferentes de resistencia que incluyen hasta 7 antibióticos. La resistencia a múltiples drogas (MDR) fue observada en el 20,5% de las cepas analizadas. El antibiótico que presentó la mayor tasa de resistencia fue Oxitetraciclina. En las cepas aisladas de alimento los serovares predominantes fueron S. Derby (2,94%) y S. Senftenberg (2,94%), los cuales son frecuentes de encontrar en alimentos destinados al consumo animal. En las muestras de origen animal los serovares predominantes fueron S. Infantis (33,82%) y S. GRUPO E (3,9;-;-) (23,53%). La frecuencia de resistencia encontrada en este estudio y el riesgo que existe de que estas cepas lleguen al hombre a través de la cadena alimentaria sugieren un estudio de seguimiento de este patógeno a fin de establecer un monitoreo de la resistencia a nivel nacional.

**Palabras clave:** Salmonella, Susceptibilidad Antibiótico, Concentración Mínima Inhibitoria

## II. SUMMARY

### ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY IN STRAINS TO *Salmonella enterica* FROM ANIMAL AND FOOD

Resistance to one or more antimicrobials in bacteria has spread and is worrying. Were analyzed *Salmonella enterica* isolates of animal and food from the Laboratory of Veterinary Microbiology at the University of Concepción, to determine the susceptibility to antibiotics used in human and animal therapy. The samples were isolated according to traditional microbiological methods standardized protocols. The determination of resistance was performed by Kirby-Bauer method and minimum inhibitory concentration (MIC) according to CLSI standards. Of the 68 strains isolated from animal and food origin, was identified 9 serovars. Strains were found resistant to one or more antibiotics in 54.68% of the strains, with 11 different resistance patterns that includes up to 7 antibiotics. Multidrug resistance (MDR) was observed in 20.5% of the strains. The antibiotic had the highest rate of resistance was Oxytetracycline. In the food isolates were the predominant serovars *S. Derby* (2.94%) and *S. Senftenberg* (2.94%), which are frequently found in food for animal consumption. In samples of animal origin were the predominant serovars *S. Infantis* (33.82%) and *S. GROUP E* (3.9 ;;-) (23.53%). The frequency of resistance found in this study and the risk exists that these strains to reach the man through the food chain suggest a follow-up study of this pathogen to establish a monitoring of the national resistance.

**Keywords:** *Salmonella*, Antibiotic Susceptibility, Minimum Inhibitory Concentration.

### III. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existe un problema creciente de infecciones bacterianas de difícil tratamiento debido a la resistencia a los antibióticos, causada por el uso inadecuado y masivo de ellos, tanto en medicina humana como veterinaria. La resistencia a antibióticos provoca un fracaso en el tratamiento instaurado pudiendo llegar a causar la muerte de un individuo. Sumado a esto, nuevos datos indican que las enfermedades bacterianas causadas por cepas resistentes pueden ser más graves que las causadas por cepas sensibles, especialmente para *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.*, en cuanto al número de casos y su impacto. La resistencia a antibióticos ha evolucionado hasta establecer una multiresistencia en algunas cepas de *Salmonella*, lo que constituye un problema de preocupación significativa en medicina veterinaria y salud pública, ya que la magnitud de este problema no es completamente conocida en nuestro país. En el mundo, cada año se notifican millones de casos que dan origen a miles de muertes. Hoy en día, en comparación a los años ochenta, los problemas relacionados con *Salmonella* han aumentado significativamente, tanto en incidencia como en gravedad de los casos que afectan a los seres humanos. La gastroenteritis es la manifestación más común de la salmonelosis, suele tratarse de un cuadro leve y autolimitado que no requiere tratamiento antibiótico. Sin embargo, el aumento del número de pacientes inmunocomprometidos y su mayor supervivencia, en que la infección es extraintestinal o cursa con bacteriemia, es esencial la instauración precoz de un tratamiento antibiótico eficaz. Desafortunadamente, el tratamiento empírico de este tipo de infecciones se ha visto complicado por el progresivo aumento de la resistencia que han experimentado las cepas de *Salmonella enterica* frente a antibióticos considerados tradicionalmente activos como cotrimoxazol, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas.

*Salmonella* se encuentra en el tracto gastrointestinal de animales destinados a consumo humano, por lo que el riesgo de contraer este patógeno está asociado principalmente a la inadecuada manipulación de los alimentos.

Es de importancia en estos momentos, en primer lugar, detectar aquellas cepas de *Salmonella* que presentan resistencia a antibióticos tanto en humanos, animales y alimentos y también lograr una orientación del uso prudente de los antibióticos de uso veterinario para establecer un mejor manejo en el área de producción.

### **Generalidades de *Salmonella***

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las enterobacterias y sus características morfológicas y bioquímicas están detalladas en el Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey (Le Minor, 1984). Son bacilos gram-negativos de un tamaño que oscila entre 0,7 x 2 y 1,5 x 5 micras, anaerobias facultativas, que se mueven por flagelos peritricos aunque también hay serovares inmóviles que comprenden *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. Su temperatura óptima de crecimiento es a 37°C. Son fermentadores de glucosa, no así de lactosa y sacarosa, con producción de ácido y gas. Sólo el 1% de las cepas de *Salmonella* fermentan la lactosa, la mayoría de estas cepas pertenece al serogrupo C. Producen la enzima catalasa y en la prueba citocromo oxidasa dan negativo. Reducen los nitratos a nitritos. Se adaptan fácilmente a condiciones extremas y pueden llegar a multiplicarse dentro de un rango de 4 a 54°C y han mostrado poseer habilidades psicrófilas, las cuales se ven reflejadas en la capacidad de crecer en alimentos almacenados a 2-4°C. Su temperatura óptima de crecimiento va desde 35 a 37°C. El pH óptimo para su proliferación es de 6,5 a 7,5, pero dada la adaptabilidad de estos microorganismos, pueden también crecer a pH de 4,5 a 9,5 (incluso algunas cepas son capaces de proliferar en pH estomacal) (Beauchat and Montville, 1997). Pueden desarrollarse a actividades de agua ( $a_w$ ) de 0,945 a 0,999,

aunque en productos deshidratados pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo. En los alimentos pueden multiplicarse hasta valores de  $a_w$  de 0,93 (Gledel, 1995; Mossel *et al.*, 2002).

En la actualidad se conocen más de 2500 serovares diferentes, algunos con gran virulencia y resistencia a múltiples antibióticos (Popoff *et al.*, 2004; Lauderdale, *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007). La taxonomía de *Salmonella* describe 2 especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (V). *S. enterica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I); *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (II); *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (IIIa); *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb); *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (IV); *Salmonella enterica* subsp. *indica* (VI). *S. enterica* subsp. I tiene alrededor de 1500 serovares y muchas infecciones en animales de sangre caliente son causadas por ella (Kim *et al.*, 2006).

La taxonomía del género *Salmonella* es reflejada mediante una nomenclatura en la que por un lado, los serovares que pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* son designados por un nombre relacionado con el lugar geográfico en donde fue aislado por primera vez. Este nombre es escrito en letras romanas (no en cursiva) y la primera letra es una letra mayúscula. Por otro lado, los serovares pertenecientes a otras subespecies son designados por sus fórmulas antigénicas, a raíz del nombre de la subespecie. Esto es simplificado mediante el esquema de Kauffmann – White (Popoff *et al.*, 2004).

### **Tipificación bacteriana**

Los métodos de tipificación pueden ayudar a identificar cepas no relacionadas entre sí y en conjunto con estudios epidemiológicos se pueden determinar las fuentes y rutas de infección (Prat *et al.*, 2001).

Entre los métodos de tipificación se encuentra la serotipificación, la cual enfrenta la cepa en estudio con sueros que contienen anticuerpos que reconocen antígenos característicos; en el caso de *Salmonella* se basa en la caracterización de sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y rara vez del antígeno capsular (Vi). Se observa por aglutinación en portaobjetos (Echeita *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Muchos serovares de *Salmonella* expresan dos tipos de antígenos flagelares, denominados antígenos de fase 1 y de fase 2, que son expresados alternativamente por un mecanismo llamado “cambio de fase”. El método más frecuentemente empleado en la tipificación de *Salmonella* es la fagotipificación, basada en la capacidad de algunos fagos de unirse a determinantes concretos de la pared celular, infectando y lisando la bacteria, generalmente específicos para cada serovar (Echeita *et al.*, 2005).

La caracterización molecular es útil en muchos casos para diferenciar cepas bacterianas ya sea mediante electroforesis en agarosa convencional o electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), ambas presentan un enorme poder resolutivo para grandes moléculas de DNA, incluyendo fragmentos de genomas bacterianos (Usera *et al.*, 1998; Laconcha *et al.*, 2000; Sandvang *et al.*, 2000). La PGFE se ha empleado con éxito en la tipificación epidemiológica de diferentes serovares de *Salmonella* (Usera *et al.*, 1998; Laconcha *et al.*, 2000; Sandvang *et al.*, 2000).

En Chile la tipificación bacteriana de *S. Enteritidis* que más se ha utilizado corresponde a la tipificación fágica, encontrándose una predominancia de fagotipos 4 y 1, que presentan una clara distribución regional dentro del país. En el norte del país predomina el fagotipo 1 y en las regiones centro y sur, el fagotipo 4. La concordancia entre los fagotipos de interés en el medio clínico y los que se han identificado en alimentos ligados a brotes y en muestras avícolas destaca la importancia de los productos avícolas en la epidemiología y la transmisión de las infecciones por *S. Enteritidis* (Prat *et al.*, 2001).

### **Cuadro Clínico en humanos**

En Chile, la mayoría de las salmonelosis son producidas por *S. Enteritidis*, seguida en incidencia por *S. Typhi* y *S. Typhimurium* y en mucho menor medida por otros serovares. La resistencia presentada por *S. Enteritidis*, de acuerdo a datos presentados por la OPS en el marco del proyecto para fortalecer la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, indica que en el periodo 1996-1998 en Chile, este serotipo presenta resistencia a cloranfenicol, trimetoprima-sulfametoxazol y ampicilina (Fica *et al.*, 2001).

La infección con *S. Enteritidis* casi siempre se manifiesta como una gastroenteritis aguda con remisión espontánea. La infección se produce como consecuencia de la ingestión de *Salmonellas* viables. Los síntomas de la enfermedad pueden variar enormemente, pero por lo general se presentan 12 a 72 horas después de la ingestión del alimento o agua contaminados y suelen durar de 4 a 7 días. Pueden presentarse desde un severo dolor de cabeza a una diarrea intensa y vómitos, pudiendo llegar incluso a un compromiso sistémico por permeabilidad del intestino a las bacterias y migración de éstas, por el torrente sanguíneo, a otros lugares del organismo (Biberstein and Zee, 1994, FDA, 2010). La identificación de *S. enterica* se realiza a partir de hemocultivos de entre el 1% y el 4% de las personas inmunocompetentes con gastroenteritis, aunque también es diagnosticada mediante coprocultivos si existe relación del cuadro con consumo de alimentos, específicamente derivados de carne de ave y huevos (Allerberger *et al.*, 1986; Ruiz *et al.*, 2000; Fica *et al.*, 2001).

En Chile las tasas de casos de diarrea por *S. Enteritidis* han aumentado de menos de 0,35 casos por 100.000 en el período de 1975–1992 a 3,41 por 100.000 en 1994, y sobre 5 por 100.000 en 1998, un incremento de más de 3000% en relación a los esporádicos casos registrados en años anteriores (Fica *et al.*, 2001; Prat *et al.*, 2001).

### **Reservorio de *Salmonella spp.***

La amplia distribución de *Salmonella enterica* en el entorno, su prevalencia en la cadena alimentaria global, su virulencia y adaptabilidad tienen un enorme impacto en medicina, en la salud pública y sobre la economía dado el incremento de los brotes que se han presentado tanto en Chile como a nivel mundial (Whiting *et al.*, 2000; Rabsch *et al.*, 2000; Fica *et al.*, 2001).

Casi todas las *Salmonellas* están enormemente diseminadas en la naturaleza y su principal reservorio corresponde a los tractos gastrointestinales de mamíferos, reptiles, aves e insectos domesticados y salvajes. Se ha detectado, por ejemplo, que las garzas, palomas y gaviotas son portadoras de *Salmonella* en cerca de un 17% (Wray and Davies, 2000), estos animales jugarían un importante rol en la diseminación de éste microorganismo en el medio ambiente (Gopee *et al.*, 2000).

En Chile se ha detectado *Salmonella spp.* en palomas sanas durante un estudio realizado en Santiago, este aislamiento corresponde a un 3% de presentación del patógeno (Toro *et al.*, 1999). Gonzalez-Acuña *et al.* (2007), señalaron un 4% de palomas positivas, principalmente juveniles, en un estudio realizado en la ciudad de Chillán. Además otros estudios han demostrado que 1,5% de 202 moscas atrapadas en trampas estaban contaminadas con *S. Typhimurium* (Wray and Davies, 2000). Los roedores domésticos son probablemente una fuente subestimada de infección por *Salmonella* en los seres humanos, se han aislado cepas de *S. Typhimurium* desde hámsters en Estados Unidos, relacionadas con casos humanos producidos por la misma cepa (Swanson *et al.*, 2007).

También el hombre es un importante reservorio (Gracey *et al.*, 1980) y la diseminación de cepas multirresistentes a través del tráfico humano sería la

forma más probable de transporte internacional de cepas multirresistentes (CDC, 1982). Algunos serovares de *S. enterica*, como el Typhi, están muy adaptados al hombre y no se le conocen otros huéspedes (Allerberger *et al.*, 2002).

El animal más frecuentemente implicado como reservorio de *Salmonella spp.* son las gallinas. Los huevos se contaminan a su paso por el oviducto de gallinas infectadas. Normalmente es la cáscara la que está contaminada pero en ocasiones la contaminación se produce en el ovario y afecta también al interior del huevo. Se estima que *S. Enteritidis* en Chile estaría ligada principalmente a la industria avícola, que ha experimentado una fuerte industrialización desde la década de los 80 (Fica *et al.*, 2001). Hay estudios en Chile que indican detección de *Salmonella* en un 12,1% en carne y menudencias de pollo, 0,8% en yemas de huevo y 0,2% en cáscaras de huevo (Alexandre *et al.*, 2000). La mayoría de los huevos contaminados en forma natural tienen muy bajos niveles de *S. Enteritidis*, incluso menos de 10 bacterias. Sin embargo, el número de huevos contaminados y los niveles de contaminación aumentan a medida que avanza el período de postura de las gallinas infectadas (Hammack *et al.*, 1993).

Además del hombre y los animales otros vehículos participan en la diseminación de Salmonelosis, entre ellos, la leche no pasteurizada, los quesos producidos a partir de ella, la carne mal cocinada o las verduras mal lavadas, es decir, la transmisión de esta cepa por la cadena alimentaria y las malas prácticas de manipulación están directamente asociadas (Fica *et al.*, 2001).

Durante los meses correspondientes a las estaciones de primavera y verano la salmonelosis presenta un claro predominio, principalmente debido al aumento en la temperatura ambiental que facilitaría la proliferación de la bacteria. Por

esto sería más fácil detectar este patógeno en el medio ambiente y en las aves durante éstas estaciones (Craven *et al.*, 2000).

Es por esto que la salmonelosis es un problema importante desde el punto de Salud pública, pero aparte de esta gran importancia y de sus posibles implicaciones en el comercio internacional de alimentos de origen animal, la salmonelosis también tiene un impacto a nivel de salud animal. *Salmonella* puede causar enfermedad y muertes en los animales, lo que implica mayores costos de producción y por ende una menor rentabilidad de la explotación. Por otra parte, la infección por *Salmonella* no siempre resulta en enfermedad y puede producirse una infección subclínica en la que la bacteria puede ser eliminada por heces durante meses sin que el animal muestre ninguna sintomatología. Aunque su hábitat principal sea el tracto intestinal de personas y animales, el género *Salmonella* se caracteriza por su habilidad para sobrevivir y multiplicarse dentro un amplio rango de sustratos y condiciones ambientales. Determinados factores relacionados con la alimentación, el manejo, la sanidad y las medidas de bioseguridad se han asociado a elevados niveles de *Salmonella* entre la población animal. Debido a su naturaleza ubicua, su erradicación de las granjas es prácticamente imposible. Por este motivo, el objetivo de los programas de control debería centrarse en reducir al máximo su presencia en las explotaciones; básicamente mediante la combinación de medidas para minimizar su introducción y posterior diseminación en las granjas (Creus, 2005).

### **Antibióticos en Medicina Veterinaria**

El uso de los antibióticos se remonta al año 1943, en donde el primer antibiótico de uso natural fue la penicilina, la que se utilizaba en humanos (Cancho *et al.*, 2000). A principios de la década de los 50 se descubrió que pequeñas dosis de tetraciclina mejoraban el crecimiento del ganado, con lo que se inicia también el uso de estos fármacos en Medicina Veterinaria. A finales

de la década de los 60 surgieron los primeros reportes sobre el incremento de resistencias de *Salmonella* al cloranfenicol y la posible implicancia del consumo de antibióticos como promotores de crecimiento en la aparición de aislados clínicos resistentes. Esta preocupación surge ya que existen diferentes vías de transmisión, especialmente a través de la cadena alimentaria, que pudiesen hacer llegar estos microorganismos resistentes al ser humano y con ello las implicancias en la salud de la población (Cancho *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2004).

Desde mediados de la década de los ochenta, comienzan a reportarse resistencias de *Salmonellas* a diversos antibióticos, es así, que Holmberg *et al.* (1984) identificaron 18 personas de 4 estados diferentes de EEUU que se infectaron con *S. Newport* con resistencia a ampicilina, carbenicilina y tetraciclina al consumir hamburguesas de carne bovina.

El uso indiscriminado de antibióticos en animales puede aumentar la selección de bacterias resistentes, que no sólo pueden infectar al hombre sino también causarle enfermedad. Se ha evidenciado la asociación entre el uso de antimicrobianos en alimentos animales asociado a resistencia antimicrobiana de *Salmonella* aisladas en humanos. Esto trae consecuencias sobre la salud humana como infecciones de mayor severidad y aumento de la frecuencia en tratamientos fallidos (Angulo *et al.*, 2004a).

Datos del sistema de vigilancia de brotes de enfermedades infecciosas intestinales en Inglaterra y Gales indican un 15% de brotes de esta naturaleza, implicando a *Salmonella* en el 12% de los casos. El modo de transmisión que se describió principalmente fue de persona a persona, seguida por consumo de alimento y la cepa involucrada fue *Salmonella* Enteritidis PT4. La infección por *Salmonella* llevó a la muerte a cinco pacientes durante este periodo (Wall *et al.*, 1996).

En el caso de *Salmonella* resistente a antibióticos se ha demostrado claramente su paso desde los animales al hombre y el desarrollo posterior de infecciones, junto a problemas de alergias en consumidores, presentados por efecto de residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal (Holmberg *et al.*, 1984; Heisig *et al.*, 1995).

Es importante señalar que en la actualidad los científicos consideran que la resistencia a antibióticos es más preocupante en el grupo de las quinolonas, tan usado en veterinaria (enrofloxacino), además de las cefalosporinas de tercera generación (Angulo *et al.*, 2004b). La resistencia a estos antibióticos es altamente indeseable dado la gran eficacia de los mismos para el tratamiento de algunas enfermedades graves producidas por microorganismos multiresistentes y aunque no esté del todo demostrada su implicancia en la aparición de cepas multirresistentes en humanos, es evidente que influye de forma considerable, por lo que se deben tomar medidas a este nivel para maximizar el beneficio terapéutico de este grupo de antibióticos y minimizar la amenaza de la resistencia. Países como Japón sólo permiten el uso de quinolonas en animales, cuando éste sea el único tratamiento de elección, siempre bajo la supervisión de un veterinario y durante un tiempo máximo de cinco días (Nakamura, 1995). Dado que las fluoroquinolonas son uno de los antimicrobianos de elección para tratar las infecciones graves producidas por *Salmonella* en humanos, una reducción en la sensibilidad a fluoroquinolonas puede tener importantes implicancias clínicas (Orden Gutiérrez y De La Fuente, 2001; Helms *et al.*, 2002).

La alarma social creada por la implicancia del uso de antibióticos en animales frente a la aparición de cepas resistentes en muestras de origen humano ha provocado distintas reacciones; por ejemplo Rusia ha comunicado su rechazo a la importación de pollos procedentes de EEUU por la presencia de residuos de antibióticos en su carne a lo que gran parte de los productores de este país

han respondido paralizando el uso de quinolonas para el tratamiento de animales enfermos (Lipsitch *et al.*, 2002).

Han surgido nuevos serovares en los últimos años que presentan la característica de multiresistencia, incluidas las quinolonas, entre ellas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, *Salmonella enterica* serovar Cholerasuis, *Salmonella* Typhimurium U302 (Zhao *et al.*, 2007). *Salmonella* Typhimurium DT104 se aisló por primera vez en Noruega desde un viajero en 1990; y el primer aislamiento en un enfermo que supuestamente adquirió la infección en Noruega se registró en 1994. Dos años después el 30% de los aislamientos de *S. Typhimurium* era DT104 multiresistente (Alvseike and Skerve, 2002). En 1996, se encontraron en Holanda diversas piaras de cerdos en las que se pudo aislar *S. Typhimurium* DT104 (Sandvang *et al.*, 1997).

Existe una mayor agresividad de este fagotipo frente al resto; Wall *et al.*, (1994) encontraron que el 36% de los pacientes afectados por cepas de *Salmonella* DT104 multiresistente, necesitaron ingreso hospitalario y la mortalidad fue del 3%. Villar *et al.*, (1999) en un brote que tuvo lugar en EEUU observaron una alta incidencia (72%) de diarrea sanguinolenta en los pacientes afectados por este fagotipo. No obstante no hay evidencias de que la cepa sea más invasiva y el riesgo de producir bacteriemia no es mayor que en el resto de los fagotipos.

Muchos microorganismos presentan resistencia a múltiples antibióticos, y debido a que la diseminación de genes de resistencia puede ocurrir entre cepas bacterianas de distinta especie y origen, el impacto en Salud pública es relevante (Rice, 2000; Van den Bogaard *et al.*, 2002).

Las sulfonamidas son fármacos de amplio espectro que inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas, gram negativas y ciertos protozoos. Bacterias tales

como *Pasterurella*, *Proteus*, *Salmonella* y *Haemophilus*, muestran una sensibilidad moderada a las sulfonamidas, pero suelen ser susceptibles a la combinación de sulfonamidas con diaminopirimidinas. Debido a la aparición de resistencia a este agente y a la acción sinérgica con diaminopirimidinas, es que en la actualidad las combinaciones más utilizadas en medicina veterinaria son las de trimetoprim con sulfadiazina o con sulfametoxazol. La actividad antibacteriana de la mayoría de las sulfonamidas es similar, por lo que analizar susceptibilidad en un miembro de este grupo es válido para todas las sulfonamidas (Martín-Jiménez, 2002a).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son de tipo bactericida y son activos tanto frente a bacterias gram positivas como gram negativas, siendo sintetizadas a partir del hongo *Penicillium* y todos los antibióticos de este grupo presentan un anillo  $\beta$ -lactámico. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las proteínas fijadoras de penicilinas (PLP) impidiendo la polimerización y entrecruzamiento de cadenas de peptidoglicanos, que aportan rigidez a la pared celular y dan protección a la membrana citoplasmática frente a desequilibrios osmóticos. Esta inhibición da lugar a una pared celular débil, que no es capaz de soportar el medio interno bacteriano y se rompe durante el proceso de división celular, llevando a una bacteriólisis (Martín-Jiménez, 2002b).

Las cefalosporinas son antibióticos de amplio espectro de acción, originados a partir del hongo *Cephalosporium acremonium*. Su mecanismo de acción es similar al resto de los fármacos  $\beta$ -lactámicos. Su unión a la PLP de la pared bacteriana interrumpe el proceso de formación de ésta durante la división celular, llevando a la lisis bacteriana. Las cefalosporinas se clasifican en 4 generaciones, según su fecha de aparición y espectro de actividad. Dentro de esta clasificación Ceftiofur es un antibiótico de tercera generación, grupo que se considera lo más eficaz frente a bacterias gram negativas resistentes a otros

antibióticos (Martín-Jiménez, 2002b). Ya se han reportado cepas de *E. coli* resistentes a Ceftiofur (Donaldson *et al.*, 2006).

Las tetraciclinas se originan de diversas especies de *Streptomyces*. Se caracterizan por ser activas frente a una amplia gama de bacterias, bacilos gram positivos y gram negativos, aerobios como anaerobios, e incluso contra algunos protozoos. Presentan actividad de tipo bacteriostática, inhibiendo la síntesis de proteínas en las células bacterianas. Las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S del ribosoma, lo cual lo hace inestable, desestabilizando las uniones codón-anticodón entre el ARNt y el ARNm. Por tanto, se altera la unión del ARNt con el sitio A y así se interrumpe la etapa de elongación de la cadena polipeptídica, ya que se impide la adición de aminoácidos a la cadena en formación (Pacheco, 2002). Las tetraciclinas de uso comercial son de tipo natural (clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina y demociclina) y derivados semisintéticos de oxitetraciclina (metaciclina, doxicilina) y derivados semisintéticos de tetraciclina (minociclina). La resistencia adquirida frente a tetraciclinas se relaciona con la alteración del sistema de transporte activo del fármaco al citoplasma, y el bombeo de éste hacia el exterior. También puede deberse a la protección del ribosoma por medio de una proteína citoplasmática que impide la acción del antibiótico sobre la subunidad 30S y se ha descrito que pueden existir enzimas que degraden el antibiótico. Todos estos mecanismos descritos se asocian a genes localizados en plásmidos y transposones, lo que facilita su diseminación entre diferentes especies bacterianas (Lemos, 2002).

Los aminoglicósidos se utilizan principalmente en infecciones de bacterias gram negativas aerobias. Posee marcados efectos tóxicos. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas (Lemos, 2002). La resistencia asociada a genes, en su mayoría están ubicados en transposones dentro de plásmidos transferibles, lo que les brinda la posibilidad de propagación horizontal y puede explicar en

parte la distribución mundial de este novedoso mecanismo de resistencia (Doi and Arakawa, 2007). Los genes identificados se reportaron como *RmtA* y *RmtB*, posteriormente se reportó la secuencia del gen *armA* (aminoglicósidos resistente metiltransferasa) de ubicación plasmidial (Yamane *et al.*, 2005; Galimand *et al.*, 2005).

Dentro del grupo de los Fenicoles se encuentra el cloranfenicol y florfenicol. Florfenicol es un análogo fluorado del tianfenicol, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en el año 1999 para el tratamiento de infecciones respiratorias en bovinos (Cloeckaert *et al.*, 2000). El mecanismo de acción de este grupo es por medio de unión reversible a la subunidad ribosomal 50 S, inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas. Dado que es una unión de tipo reversible se considera su acción como de tipo bacteriostática (Lemos, 2002).

Florfenicol no está sujeto a la acción de la acetiltransferasa, que es una enzima utilizada por las bacterias para desarrollar resistencia a cloranfenicol y tianfenicol (Wright, 2005). Existen mecanismos de resistencia descritos como sistemas de expulsión específicos, mediante plásmidos como el gen *floR* (Doublet *et al.*, 2005).

Las primeras 4-quinolonas sintetizadas fueron ácido nalidixico y ácido oxolínico, con un estrecho margen de actividad antibacteriana, activas sólo frente a enterobacterias gram negativas. Esta molécula fue modificada posteriormente dando origen a las fluoroquinolonas que poseen mayor espectro de acción incluyendo bacterias gram positivas. Las fluoroquinolonas y quinolonas, se encuentran entre los nuevos agentes antimicrobianos de uso clínico, actuando por inhibición de la síntesis de ADN. El norfloxacinó fue la primera fluoroquinolona introducida en el mercado veterinario en el año 1986. También se utiliza el enrofloxacinó y la flumequina en el tratamiento de infecciones animales. Las fluoroquinolonas son bactericidas y la resistencia se produce por reducción de la penetración a través de la pared celular bacteriana

y por mutaciones de la ADN girasa, a la fecha no se han identificado enzimas capaces de degradar las fluoroquinolonas. La resistencia por plásmidos es muy rara (Lees y Shojaee Aliabadi, 2002). La resistencia cruzada entre quinolonas se observa con mayor frecuencia entre las más antiguas, como el ácido nalidíxico y el flumequina, pero puede existir entre éstas últimas y las fluorquinolonas, y entre fluorquinolonas entre sí (Otero, *et al.*, 2001). Uno de los mecanismo de resistencia frente a fluoroquinolonas es debido a mutaciones en la codificación de genes de la subunidad de la ADN girasa (*gyrA*) y ocasionalmente por topoisomerasas IV (*parC*), ambas enzimas de tipo blanco (Hooper, 2001; Engberg *et al.*, 2001). Las topoisomerasas actúan rompiendo ambas hebras del segmento de ADN, pasando segmentos distintos a través de la ruptura, y luego unir los genes. La ADN-girasa, produce una introducción (o eliminación) de ADN superenrollado, lo que afecta negativamente al superenrollamiento de ADN necesarios para iniciar la replicación del ADN. En ambos casos, las fluoroquinolonas aparecen como trampa de la enzima sobre el ADN durante la reacción de topoisomerización, formando una barrera física para el movimiento de la horquilla de replicación, ARNA polimerasa y ADN helicasa. Finalmente se origina la muerte celular (Hooper, 2001).

### **Genes de Resistencia a Antibióticos**

Se cree que muchos de los genes de resistencia provienen de los microorganismos productores de antibióticos, que los poseen como forma de protección frente al efecto de las sustancias que ellos mismos elaboran, y otros se deberían a mecanismos de mutación. Se han identificado una serie de elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia, de estos los más conocidos son los plásmidos, los transposones, los integrones y cassettes genéticos de resistencia. Los genes de resistencia localizados en integrones presentan una alta eficiencia recombinatoria identificados como parte de la familia Tn 21, poseen una estructura conservada y varios determinantes de resistencia; se conocen cuatro tipos de integrones

en función del tipo de integrasa, siendo el más conocido la familia de la clase 1 (Álvarez-Fernández *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2004).

La transferencia de estos elementos entre diferentes bacterias puede ocurrir por conjugación, transformación o transducción, procesos básicos de transferencia de genes entre bacterias. En la actualidad, es bien conocido el rol de plásmidos y transposones en la multirresistencia de las bacterias a los antibióticos y en la diseminación natural de los determinantes de resistencia. Sin embargo, sólo en los últimos años se está estudiando la participación de los *cassettes* genéticos de resistencia y de los integrones en el proceso evolutivo de los plásmidos de resistencia (plásmidos R) (González *et al.*, 2004). Los integrones de clase 1 son los más frecuentemente aislados de muestras clínicas (Sallen *et al.*, 1995). Han sido detectados principalmente en bacilos gram negativos fermentadores de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* y en algunos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (González *et al.*, 2004). Su papel en la transmisión horizontal de resistencias cobra mayor importancia recientemente con el descubrimiento de los superintegrones (SI) (Rowe-Magnus and Mazel, 2001). En las dos especies del género *Salmonella*, pero fundamentalmente en el serovar Typhimurium se han encontrado integrones de clase 1 portando múltiples combinaciones de *cassettes* con distintos genes de resistencia. Aunque normalmente la localización de estos integrones es cromosómica, también se ha descrito su localización en plásmidos conjugativos y no conjugativos. Las cepas donde se han localizado estos integrones son tanto de origen humano como animal, e incluso se han descrito en microorganismos presentes en el agua o en alimentos (Natasi and Mammina, 2001).

Se postula que los primeros genes de resistencia aparecieron en las bacterias productoras de antibióticos que necesitaron desarrollar mecanismos que las hicieran resistentes a los antibióticos que ellas mismas sintetizaban. Varios

datos apoyan esta teoría, como el hecho de que los genes implicados en la síntesis de antibióticos se encuentren en la misma región que los genes que confieren resistencia. Además, algunas empresas elaboradoras de antibióticos han publicado antecedentes que señalan que han detectado material genético, en concreto genes de resistencia, contaminando los antibióticos que producen y plantean que ésta sea una de las fuentes de propagación de la resistencia (Webb and Davies, 1993).

Normalmente el antibiótico no influye en la aparición de resistencias salvo algunos grupos como las quinolonas, cuya capacidad mutágena incrementa la tasa de mutación en la bacteria, provocando un estado de estrés que la hace más susceptible de sufrir estas mutaciones. Una vez que la bacteria es resistente al antibiótico es capaz de transmitir su resistencia de forma vertical a su descendencia o de forma horizontal a otras bacterias que pueden ser de distinta especie e incluso género (Taddei *et al.*, 1997).

La conjugación permite la transferencia de plásmido entre distintos géneros bacterianos incluso algunos muy alejados filogenéticamente, algo que no ocurre con la transformación y la transducción. No obstante las bacterias gram-positivas tienen más facilidad para transferir su material genético y es mucho más frecuente encontrar genes de resistencia a antibióticos específicos de microorganismos gram-positivos que en gram-negativos (Brisson-Nöel *et al.*, 1988).

Existen programas de vigilancia de resistencia antimicrobiana orientados principalmente a patógenos humanos, agentes causantes de zoonosis y bacterias indicadoras (Lanz *et al.*, 2002). Esto dado que la resistencia en estos microorganismos va en aumento y es de vital importancia el conocer la situación en nuestro país para tomar medidas cautelares e idear estrategias

que minimicen la presentación de resistencia tanto en antibióticos de uso veterinario como de uso humano.



## Hipótesis

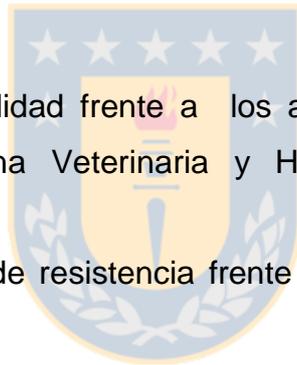
Las cepas de *Salmonella spp.* de origen animal y alimentario presentan resistencia a antibióticos de uso común en terapia veterinaria y humana.

## Objetivo General

- Determinar susceptibilidad y patrón de resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella enterica* aisladas desde muestras de origen animal y alimentario.

## Objetivos Específicos

- Determinar susceptibilidad frente a los antibióticos más comúnmente utilizados en Medicina Veterinaria y Humana en los aislados de *Salmonella enterica*.
- Determinar patrones de resistencia frente a siete antibióticos utilizados en el estudio.
- Establecer diferencias entre la probabilidad de resistencia a los antibióticos según serovar de *Salmonella* y origen de aislamiento.



## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **Aislados bacterianos**

Los aislados bacterianos fueron obtenidos de diversas muestras analizadas en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, durante dos años (junio de 2007 a junio de 2009).

Las muestras para análisis microbiológico se llevaron a un medio de pre enriquecimiento correspondiente a agua peptona tamponada durante 24 h a 37°C. Luego pasaron a un medio de enriquecimiento selectivo, caldo Rappaport Vassiliadis durante 24 h a 37°C. Para el diagnóstico selectivo se utilizó agar XLD con Novobiocina (15µg/mL) incubado por 48 h a 42°C. La confirmación bioquímica se realizó a través de los medios TSI, LIA, Citrato de Simmons y SIM, método descrito por la FDA/AOAC/BAM (FDA, 1995).

Los cultivos sospechosos se sometieron a identificación serológica utilizando suero polivalente O (Lab. Denka Seiken Co, Ltda). Luego de esto, aquellas que presentaron macroaglutinación, fueron enviadas al Instituto de Salud Pública, laboratorio de referencia nacional para su serotipificación. Una vez aisladas las cepas fueron mantenidas en cepario (-20°C).

### **Resistencia a antibióticos**

Una vez tipificadas, las cepas aisladas durante el periodo fueron testeadas para verificar susceptibilidad a 7 antibióticos: Enrofloxacino (Enr) 30µg (Bayer®), Oxitetraciclina (Oxi) 30µg (Chemie®), Ceftiofur (Cef) 30µg (Oxoid®), Ampicilina (Amp) 10 µg (Lab. Chile®), Sulfadiazina-trimetropim (SuTri) 25µg (Valtek S.A.®), Amoxicilina (Amx) 20µg (Chemie®) y Florfenicol (Flo) 30µg (Chemie®). Se utilizó el método Kirby- Bauer bajo normas del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2008).

El cultivo de *Salmonella* se enriqueció previamente en caldo cerebro corazón (Merck®) a 37°C por 24 h. Para estandarizar la densidad del inóculo, se utilizó el estándar de turbidez de BaSO<sub>4</sub> (Estándar 0,5 McFarland) de acuerdo al procedimiento del CLSI (Cona, 2002; CLSI, 2008). Luego se sembraron por torulado, en placas de agar Mueller Hinton (Merck®). Los discos de antibióticos se ubicaron a 25 mm entre centro y centro de cada uno para evitar traslapes en la zona de inhibición. Se incubaron a 37°C por 20 h en una atmósfera aeróbica y se determinó susceptibilidad de acuerdo al diámetro que presentó el halo de inhibición de acuerdo a los estándares de la CLSI para cada antibiótico (Tabla 1). Como control de calidad, se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922 (CLSI, 2008).

Las cepas que presentaron resistencia a tres o más antibióticos de grupos farmacológicos no relacionados se consideraron como resistentes a múltiples drogas (MDR). Además con estos antecedentes se establecieron los patrones de resistencia según serovares. Aquellas cepas que presentaron susceptibilidad intermedia se consideraron como resistentes para así establecer una base de datos dicotómica y desarrollar el análisis estadístico.

### **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La CMI de antibióticos para los serovares de *Salmonella enterica* aisladas en este estudio, fue determinada mediante método de macro dilución de series de caldo Mueller Hinton (Merck®), de acuerdo a las indicaciones del CLSI (2008), a todas aquellas cepas que resultaron resistentes mediante el método Kirby-Bauer frente a uno o más de los antibióticos a analizar, excepto para Ampicilina. Adicionalmente todas las cepas fueron analizadas para determinar CMI frente al antibiótico Flumequina (Veterquímica®). Dado que no se contaba con sulfadiazina, el análisis de CMI fue realizado con sulfadoxina. Se preparó una solución madre de cada uno de los antibióticos, diluyéndolos de acuerdo a las indicaciones de la CLSI (2008), con diferentes solventes, a una

concentración inicial de 2048 µg/mL. Una vez preparados se midió pH y fueron mantenidos refrigerados y protegidos de la luz por un periodo no superior a 30 días. La lectura de los tubos fue realizada luego de su siembra en dilución al doble al agregar el inóculo por 24 horas a 37°C en caldo Mueller-Hinton, evaluando si existe o no crecimiento bacteriano. En caso de presentarse crecimiento bacteriano en un tubo, el tubo anterior a éste fue considerado como la CMI expresado en µg/ml (Tabla 1). La interpretación se basó en lo descrito por la CLSI (2008), que define susceptibilidad (resistente, intermedio, sensible) para cada antibiótico expresadas en µg/mL. Además se realizó el cálculo de la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI<sub>50</sub>) y 90 (CMI<sub>90</sub>).

**Tabla 1.** Antibióticos y concentraciones utilizadas para las pruebas de susceptibilidad de los aislados de *Salmonella enterica*.

Niveles de susceptibilidad y resistencia <sup>a</sup>					
Antibiótico	Abreviación	Kirby Bauer		CMI	
		Resistente a (mm)	Sensible a (mm)	Resistente a (µm/ml)	Sensible a (µm/ml)
Enrofloxacino	Enr	≤16 <sup>b</sup>	≥ 23 <sup>b</sup>	≥4 <sup>b</sup>	≤1 <sup>b</sup>
Oxitetraciclina	Oxi	≤14	≥19	≥16	≤4
Ceftiofur	Cef	≤17 <sup>b</sup>	≥21 <sup>b</sup>	≥8 <sup>c</sup>	≤2 <sup>c</sup>
Ampicilina	Amp	≤13	≥17	NT	NT
Sulfadiazina- trimetoprim	SuTri	≤10	≥16	NT	NT
Sulfadoxina	Sul	NT	NT	≥512	≤256
Trimetoprim	Tri	NT	NT	≥16	≤8
Amoxicilina	Amx	≤13	≥17	≥32/16	≤8/4
Florfenicol	Flo	≤12 <sup>b</sup>	≥18 <sup>b</sup>	≥32 <sup>b</sup>	≤8 <sup>b</sup>
Flumequina	Flu	NT	NT	≥4 <sup>b</sup>	≤1 <sup>b</sup>

NT : no testeado mediante este método

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

b: No hay criterio de interpretación en el CLSI, las cepas se consideran resistentes a las concentraciones indicadas

c: Criterio en base a NARMS (CDC, 2010).

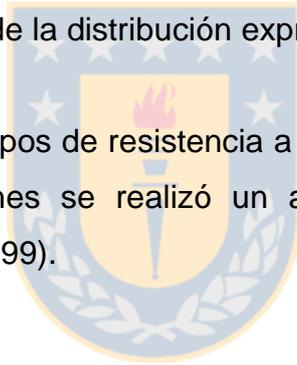
## **Análisis de Datos**

Se realizó estadística descriptiva usando frecuencias absolutas y relativas analizadas mediante chi cuadrado.

Para relacionar resistencia para cada antibiótico con el serovar de *Salmonella* y el origen de aislamiento, se realizaron regresiones logísticas multivariadas para el total de las cepas aisladas utilizando el software Stata SE 10.0 para Windows (StataCorp, 2007).

Para establecer diferencias entre las medianas de CMI de cepas resistentes (según método Kirby-Bauer) entre los serovares y orígenes de aislamiento, se realizó un test de Kruskal-Wallis, cuando exista un número adecuado de datos. Se analizó la dispersión de las CMI mediante el rango intercuartil (RIC) que representa la  $CMI_{25}$  y  $CMI_{75}$  de la distribución expresado en  $\mu\text{m/mL}$ .

Además, para buscar los grupos de resistencia a antibióticos más relacionados con los serovares y orígenes se realizó un análisis de correspondencias múltiples (MCA) (Vivanco, 1999).



## V. RESULTADOS

### Aislamiento de cepas

Las cepas obtenidas del laboratorio de Microbiología corresponden a 68 aislados de *Salmonella enterica*, obtenidos entre los años 2007 y 2009, las que fueron serotipificadas por el ISP. De todas estas cepas el 92,65% se agrupa en aislados de origen animal y el 7,35 % corresponde a aislados de origen alimentario. De los 63 aislados de origen animal el 76,19% provienen de cerdos(n=48), el 15,87% proviene de gaviotas(n=10), el 4,76% de bovinos(n=3) y el 3,17% de equinos(n=2).

Se identificaron 9 serovares de *Salmonella* (Tabla 2). La mayoría de los aislados provenientes de cerdos corresponde a *S. Infantis* (33,82%), seguido de *S. GRUPO E (3,9:-:-)* (23,53%). Todas las *S. Enteritidis* (14,71%) provienen de aves y *S. Thyphimurium* (13,24%) fue principalmente aislada en animales de producción (equino, cerdo, bovino).

**Tabla 2.** Porcentaje de serovares de *S. enterica* según origen de la muestra.

Cepa Bacteriana	Alimento N° (%)	Bovino N°(%)	Equino N°(%)	Cerdo N°(%)	Gaviota N°(%)	Total N° (%)
<i>S. Thyphimurium</i>	0 (0)	3 (4,41)	2(2,94)	4 (5,89)	0 (0)	9 (13,24)
<i>S. Worthington</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,47)	0 (0)	1 (1,47)
<i>S. Infantis</i>	1 (1,47)	0 (0)	0 (0)	23(33,82)	0 (0)	24 (35,29)
<i>S. GRUPO E (3,9:-:-)</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	16(23,53)	0 (0)	16 (23,53)
<i>S. Enteritidis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10(14,71)	10 (14,71)
<i>S. Anatum</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(1,47)	0 (0)	1 (1,47)
<i>S. Derby</i>	2 (2,94)	0 (0)	0 (0)	2 (2,94)	0 (0)	4 (5,88)
<i>S. Senftenberg</i>	2(2,94)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2,94)
<i>S. Cholerasuis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(1,47)	0 (0)	1 (1,47)
Total por Cepa N°(%)	5(7,35)	3(4,41)	2(2,94)	48(70,59)	10(14,71)	68(100)

### Resistencia a Antibióticos

En las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (método Kirby Bauer) 35 cepas (54,68%) fueron resistentes a alguno de los antibióticos utilizados en el estudio, los cuales son de uso en terapia veterinaria y humana (Tabla 3). Los serovares que presentaron menor porcentaje de resistencia a antibióticos fue a Enrofloxacino (4,41%), luego a Florfenicol (7,35%), Amoxicilina (11,76%), Ampicilina (10,29%), Ceftiofur (14,71%) y Sulfadiazina-Timetoprim (20,58%), mientras que el mayor porcentaje de resistencia de las cepas aisladas corresponde a Oxitetraciclina con un 50% (Tabla 4).

**Tabla 3.** Porcentaje de serovares de *Salmonella* resistentes (Método Kirby Bauer) según origen de aislamiento

Serovar (Total)	Alimento N° (%)	Bovino N° (%)	Cerdo N° (%)	Equino N° (%)	Gaviota N° (%)	Total por serovar N° (%)
S. Thyphimurium (9)	0 (0)	3 (33,3)	2 (22,2)	1 (11,1)	0 (0)	6 (66,6)
S. GRUPO E (3,9;-;-) (16)	0 (0)	0 (0)	14 (87,5)	0 (0)	0 (0)	14 (87,5)
S. Derby (4)	2 (50)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	4 (100)
S. Senftenberg (2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)
S. Infantis (24)	0 (0)	0 (0)	8 (33,3)	0 (0)	0 (0)	8 (33,3)
S. Cholerasuis (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Total por origen (%)	4 (80)	3(100)	23 (47,91)	1 (50)	0 (0)	35 (54,68)

Del total de cepas estudiadas el 17,18% presentó MDR, que corresponde a 3 de los serovares aislados en este estudio. Estos serovares fueron S. Thyphimurium (22,2%), S. Grupo E (3,6;-;-) (43,75%) y S. Derby (50%) siendo el 90,91% proveniente de porcinos (Tabla 5).

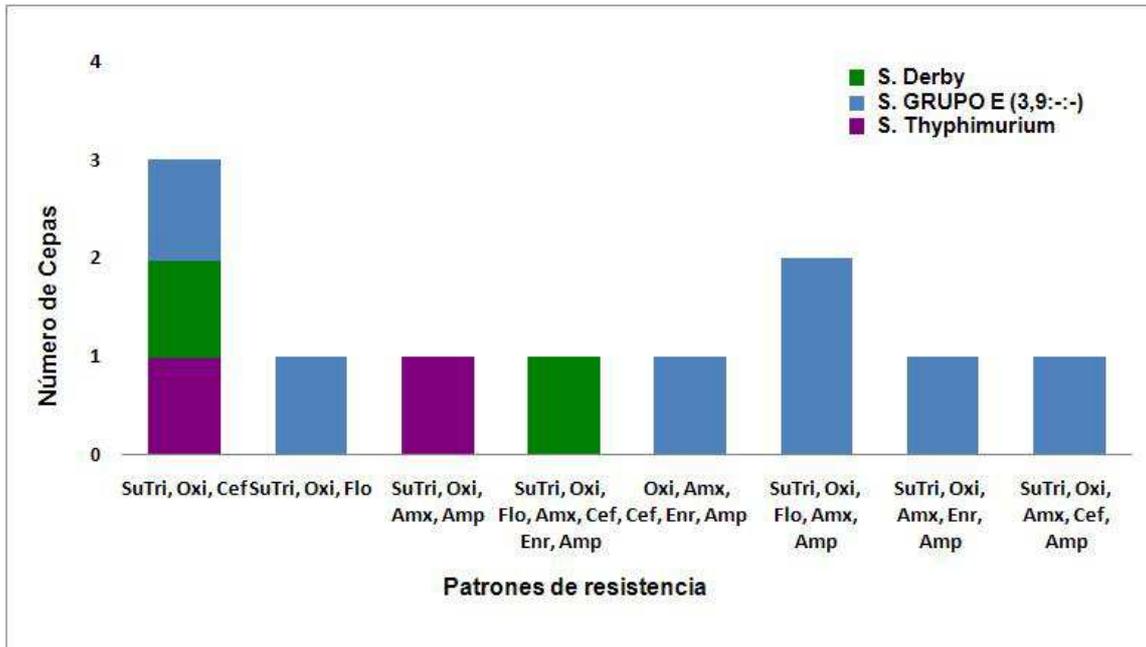
Se encontraron 11 patrones de MDR diferentes (Figura 1). El patrón que más se repite (3 cepas), incluye tres antibióticos Ceftiofur, Oxitetraciclina y Sulfadiazina-Trimetoprim, encontradas en S. Derby, S. Thyphimurium y S.

GRUPO E (3,9:-:-) (Tabla 6). El 90,9% de los patrones encontrados corresponden a aislados de cerdos.

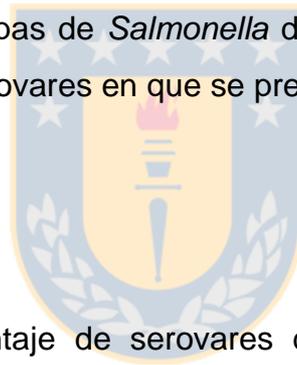
**Tabla 4.** Distribución de cepas de *S. enterica* con resistencia a algún antibiótico según serovar y origen de aislamiento de acuerdo a método Kirby Bauer.

Antibiótico	Según Serovar		Según Origen		Total N° (%)
	Serovar	N° (%)	Origen	N° (%)	
Sulfadiazina- Trimetoprim	Thyphimurium	4 (44,44)	Bovino	3 (100)	14 (20,58)
	Grupo E	6 (37,51)	Porcino	11 (22,91)	
	Derby	2 (50)	Equino	0 (0)	
	Infantis	2 (8,3)	Gaviota	0 (0)	
	Cholerasuis	0 (0)	Alimento	0 (0)	
	Senftenberg	0 (0)			
	Whorthington	0 (0)			
	Enteritidis	0 (0)			
	Anatum	0 (0)			
Oxitetraciclina	Thyphimurium	5 (55,55)	Bovino	2 (66,66)	34 (50)
	Grupo E	14 (87,5)	Porcino	24 (50)	
	Derby	4 (100)	Equino	1 (50)	
	Infantis	8 (33,33)	Gaviota	3 (30)	
	Cholerasuis	1 (100)	Alimento	4 (80)	
	Senftenberg	2 (100)			
	Whorthington	0 (0)			
	Enteritidis	0 (0)			
	Anatum	0 (0)			
Florfenicol	Thyphimurium	0 (0)	Bovino	0 (0)	5 (7,35)
	Grupo E	4 (25)	Porcino	5 (10,41)	
	Derby	1 (25)	Equino	0 (0)	
	Infantis	0 (0)	Gaviota	0 (0)	
	Cholerasuis	0 (0)	Alimento	0 (0)	
	Senftenberg	0 (0)			
	Whorthington	0 (0)			
	Enteritidis	0 (0)			
	Anatum	0 (0)			

Ceftiofur	Thyphimurium	1 (11,11)	Bovino	0 (0)	10 (14,71)
	Grupo E	6 (37,5)	Porcino	9 (18,75)	
	Derby	2 (50)	Equino	0 (0)	
	Infantis	0 (0)	Gaviota	0 (0)	
	Cholerasuis	0 (0)	Alimento	1 (20)	
	Senftenberg	1 (50)			
	Whorthington	0 (0)			
	Enteritidis	0 (0)			
	Anatum	0 (0)			
Amoxicilina	Thyphimurium	1 (11,11)	Bovino	1 (33,33)	8 (11,76)
	Grupo E	6 (37,5)	Porcino	7 (14,58)	
	Derby	1 (25)	Equino	0 (0)	
	Infantis	0 (0)	Gaviota	0 (0)	
	Cholerasuis	0 (0)	Alimento	0 (0)	
	Senftenberg	0 (0)			
	Whorthington	0 (0)			
	Enteritidis	0 (0)			
	Anatum	0 (0)			
Enrofloxacino	Thyphimurium	0 (0)	Bovino	0 (0)	3 (4,41)
	Grupo E	2 (12,5)	Porcino	3 (68,5)	
	Derby	1 (25)	Equino	0 (0)	
	Infantis	0 (0)	Gaviota	0 (0)	
	Cholerasuis	0 (0)	Alimento	0 (0)	
	Senftenberg	0 (0)			
	Whorthington	0 (0)			
	Enteritidis	0 (0)			
	Anatum	0 (0)			
Ampicilina	Thyphimurium	1 (11,11)	Bovino	1 (33,3)	7 (10,29)
	Grupo E	4 (25)	Porcino	5 (10,41)	
	Derby	1 (25)	Equino	0 (0)	
	Infantis	0 (0)	Gaviota	0 (0)	
	Cholerasuis	0 (0)	Alimento	1 (20)	
	Senftenberg	1 (50)			
	Whorthington	0 (0)			
	Enteritidis	0 (0)			
	Anatum	0 (0)			



**Figura N°1.** Número de cepas de *Salmonella* distribuidas según patrones de resistencia observados y serovares en que se presentó.



**Tabla 5.** Número y porcentaje de serovares de *S. enterica* con MDR en relación a su origen de aislamiento.

Cepa Bacteriana (Total)	Bovino N°(%)	Cerdo N°(%)	Total N° (%)
S. Thyphimurium (9)	1 (11,1)	1 (11,1)	2 (22,2)
S. GRUPO E (3,9:-:-) (16)	0 (0)	7(43,75)	7 (43,75)
S. Derby (4)	0 (0)	2 (50)	2 (50)
Total	1 (33,3)	10 (20,83)	11 (17,18)

**Tabla 6.** Patrones de resistencia a múltiples drogas en serovares de *Salmonella* aislados entre junio de 2007 y junio de 2009 (Método Kirby Bauer).

Serovar	Nº aislados		Patrones de resistencia antimicrobiana MDR (número de serovares resistentes/especie)
	Analizados	Resistentes (uno o más antibióticos)	
S. Thyphimurium	9	6	SuTri, Oxi, Amx, Amp (1/Bov.) SuTri, Oxi, Cef (1/Equ.)
S. GRUPO E (3,9;-;-)	16	14	Oxi, Amx, Cef, Enr, Amp (1/Cer.) SuTri, Oxi, Amx, Enr, Amp (1/Cer.) SuTri, Oxi, Flo, Amx, Amp (2/Cer.) SuTri, Oxi, Cef (1/Cer.) SuTri, Oxi, Amx, Cef, Amp (1/Cer.) SuTri, Oxi, Flo (1/Cer.)
S. Derby	4	4	SuTri, Oxi, Flo, Amx, Cef, Enr, Amp (1/Cer.) SuTri, Oxi, Cef (1/Cer.)
S. Senftenberg	2	2	**
S. Infantis	24	8	**
S. Cholerasuis	1	1	**

Bov.: Bovino/ Equ.: Equino/ Cer.: Cerdo

\*\* No hubo serovares multiresistente a drogas en estos aislados.

Al analizar en forma multivariada las cepas aisladas en este estudio la probabilidad de resistencia de ellas respecto a su origen y serovar, se encontró que *S. GRUPO E (3,9;-;-)*, tiene 7 veces más riesgo de ser resistente a oxitetraciclina que *S. Thyphimurium* ( $p \leq 0,05$ ); para este grupo de cepas, los orígenes no demostraron asociación significativa con el riesgo de resistencia ( $p \geq 0,05$ ).

### **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

En relación a la susceptibilidad *in vitro* se observó que para ceftiofur los rangos de CMI variaron entre 1-128  $\mu\text{m}/\text{mL}$ , con una  $\text{CMI}_{90}$  de 16  $\mu\text{m}/\text{mL}$  (Tabla 7). El 100% de las cepas estudiadas fueron resistentes. Los serovares resistentes corresponden a *S. Derby*, *S. GRUPO E (3,9;-;-)*, *S. Senftenberg* y *S. Thyphimurium*, ambas aisladas de cerdos.

Para enrofloxacino (3 cepas) los rangos de CMI fueron 2-16  $\mu\text{m}/\text{mL}$ , con una  $\text{CMI}_{90}$  de 16  $\mu\text{m}/\text{mL}$ . El 33,33% de las cepas presenta resistencia y el 66,66 % restante susceptibilidad intermedia. Todos los serovares son de origen animal, principalmente cerdos. *S. Derby* corresponde a un solo aislado de susceptibilidad intermedia, mientras que *S. GRUPO E (3,9;-;-)* presenta una cepa intermedia y una resistente.

Para amoxicilina, las 7 cepas resistentes por el método Kirby-Bauer fueron también resistentes según el análisis de CMI. Los rangos de CMI fueron 512-1024  $\mu\text{m}/\text{mL}$  con una  $\text{CMI}_{90}$  de 1024  $\mu\text{m}/\text{mL}$ . No se observó diferencias entre las medianas de CMI según serovar ( $p \geq 0,05$ ). Sólo *S. GRUPO E (3,9;-;-)* presentó dispersión en sus datos.

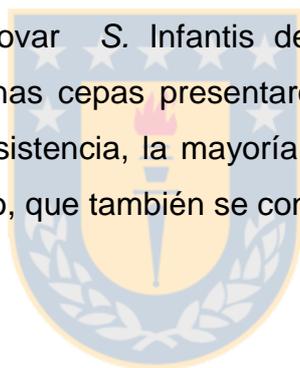
Los rangos de CMI para las 5 cepas de florfenicol analizadas fueron 16-128  $\mu\text{m}/\text{mL}$  con una  $\text{CMI}_{90}$  de 128  $\mu\text{m}/\text{mL}$ . Se observó un 60% de cepas resistentes, 20% intermedio y 20% sensible. Estas cepas provienen de un sólo origen que es animal (cerdo). Un aislado sensible y otro intermedio corresponden al serovar *S. GRUPO E (3,9;-;-)*. De los tres aislados resistentes, dos corresponden a *S. GRUPO E (3,9;-;-)* y uno a *S. Derby*.

Para oxitetraciclina (30 cepas) los rangos de CMI fueron 8-1024  $\mu\text{m}/\text{mL}$  con una  $\text{CMI}_{90}$  de 512  $\mu\text{m}/\text{mL}$ . El 96,66% de los serovares fueron resistentes y un

3,33% presentó resistencia intermedia. No se encontraron diferencias en la comparación entre las medianas de las CMI ( $p \geq 0,05$ ) según serovar ni origen.

Para sulfadoxina (12 cepas) los rangos de CMI fueron 64-512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con una CMI<sub>90</sub> de 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El 25% de los serovares fueron resistentes y el 75% sensibles. Las medianas de los valores de CMI para S. GRUPO E (3,9;-;) son menores que para S. Derby ( $p \leq 0,05$ ), es decir, el 50% de las cepas del serovar S. GRUPO E (3,9;-;) fueron inhibidos a una concentración menor de antibiótico que el serovar S. Derby, lo que indica sensibilidad (Anexo A a la D).

Para flumequina (68 cepas) los rangos de CMI fueron 1-1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con una CMI<sub>90</sub> de 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El 95,58% de las cepas presentó resistencia y sólo una cepa perteneciente al serovar S. Infantis de origen animal (cerdo), fue sensible. Pese a que algunas cepas presentaron CMI de 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para flumequina, lo que indica resistencia, la mayoría presentó CMI hasta 4 veces menores para este antibiótico, que también se consideran como resistentes.



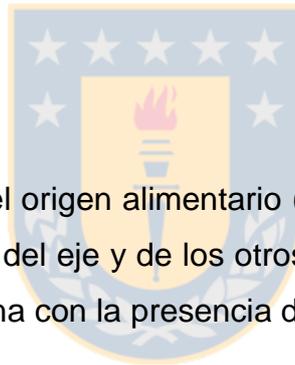
**Tabla 7.** Rangos de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y RIC en las cepas de *Salmonella* aisladas (n=35)

Antibiótico	RIC* ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CMI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CMI <sub>90</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Enrofloxacino	2-16	2	16
Florfenicol	16-128	32	128
Oxitetraciclina	8-1024	256	512
Sulfadoxina	64-512	256	512
Flumequina	1-1024	128	512
Amoxicilina	512-1024	512	1024
Ceftiofur	1-128	16	16

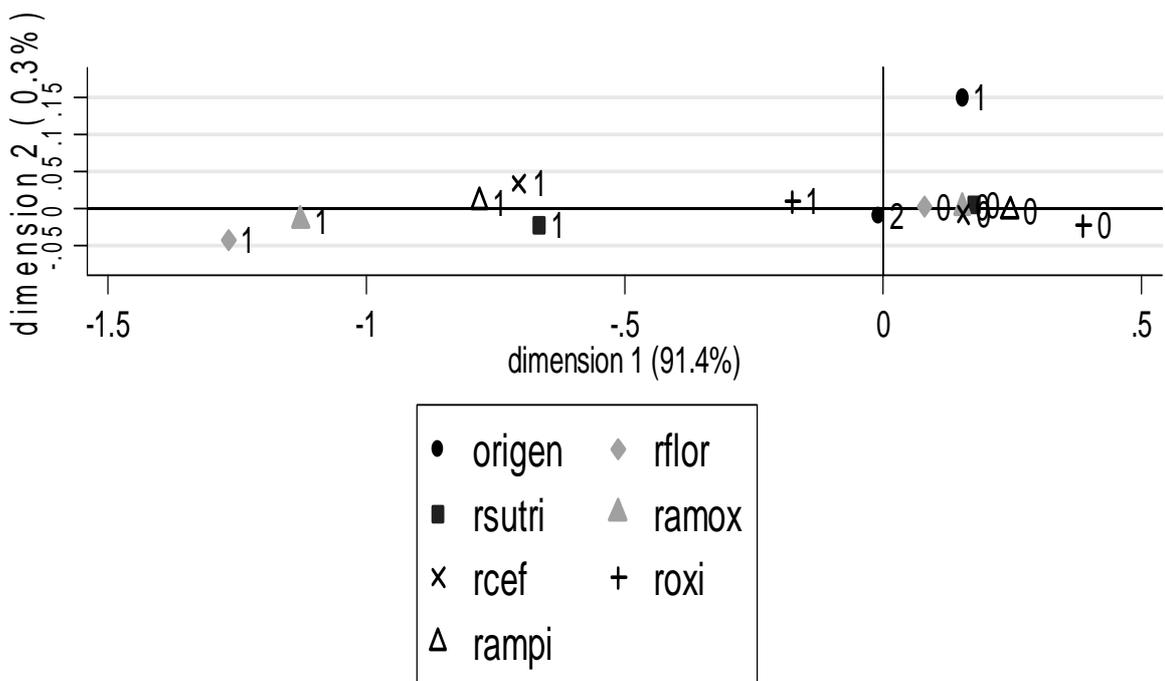
\*RIC: rango intercuartil

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

Las dos primeras dimensiones explican el 91,7% de la variabilidad total. En este caso se puede explicar con un 91,4% (dimensión 1) la variabilidad entre las cepas resistentes que se agrupan hacia la izquierda en comparación a las cepas susceptibles se agrupan en el eje hacia la derecha. Esto indicaría que las resistencias y susceptibilidades pudiesen asociarse a algún tipo de factor o efecto, dado que todas estas variables no estarían actuando de forma independiente.



De acuerdo a los orígenes, el origen alimentario (● 1) difiere del origen animal (● 2) al encontrarse alejado del eje y de los otros puntos. Esto indicaría que el origen no tiene relación alguna con la presencia de resistencia antibiótica.



**Figura N°2.** Relación entre susceptibilidad antibiótica y origen de las cepas de Salmonella. 0: susceptible; 1: resistente para cada uno de los antibióticos. Origen: 1: Alimentario; 2: Animal.

## VI. DISCUSION

Los resultados de serotipificación muestran la existencia de una amplia variedad de serovares (9) presentes en la región del Bío Bío tanto en muestras de animales y alimentos. En alimento se determinó tres serovares, uno de ellos fue *S. Derby*, el cual se describe habitualmente asociado a porcinos (Ibar *et al.*, 2009) pero en este caso el aislado provenía de alimento destinado a aves en una crianza traspatio, en la que se encontraban otros animales de granja por lo que se pudiese sospechar de una transmisión entre especies. El otro serovar más observado en alimento fue *S. Senftenberg* que se asocia también a cerdos y aves, pero también es frecuente de encontrar en alimentos destinados para consumo en plantales de engorda (Ibar *et al.*, 2009). Las prevalencias de *Salmonella* en rebaños de cerdos en países de Europa llega al 10,3% (EFSA, 2008) Es importante entonces contar con alimentos inocuos a la hora de alimentar plantales porcinos para así asegurar el estatus sanitario de los animales y minimizar el riesgo de llegar al ser humano. Además sería interesante evaluar la positividad frente a *Salmonella* tanto en reproductoras como en engordas de rebaños en la Región del Bío Bío, estableciendo prevalencias individuales y factores de riesgo asociados para poder desarrollar programas eficientes y establecer procedimientos de control económicamente factibles de realizar frente a este patógeno.

Es importante destacar que una de las cepas aisladas desde alimentos corresponde al serovar Worthington, este serovar ha sido descrito en algunos países como un patógeno causal de meningitis neonatal emergente (Ghadage and Bal, 2002; Muley *et al.*, 2004). En este estudio el serovar fue aislado de cerdo y no presenta resistencia a antibióticos, por lo que una terapia antimicrobiana frente a un brote por este patógeno debiera dar buenos resultados. Esto apoya la teoría de que todos aquellos serovares emergentes en la población, ya sea animal o humana, no debieran presentar grandes resistencias a los antimicrobianos, pero es necesario evaluar periódicamente

los serovares de *Salmonella* presentes y la resistencia presentada a lo largo del tiempo.

En el informe de la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos de la OPS (2005), se señala que en Chile los serovares más frecuentes en aislamientos de alimentos fueron: S.4,12:d:-, S. Thyphimurium, S. Senftenberg, S. Enteritidis y S. Derby. En el presente estudio los serovares Derby y Senftenberg fueron aislados desde alimentos pero destinados a consumo animal, que difiere del informe de la OPS en que fueron aislados desde alimentos destinados a consumo humano. Pese a esto, es importante señalar, que la resistencia en los aislados de alimentos analizados por la OPS y los del presente estudio, no presentan MDR.

Entre los serovares de origen animal aislados en este estudio, los más frecuentes fueron S. Infantis y S. GRUPO E (3,9;-;-). Aunque estos serovares no son descritos frecuentemente, se aislaron principalmente de cerdos. Esto indicaría que en estos planteles persisten diferentes serovares en las distintas etapas de producción que no son capaces de establecerse de forma endémica, por el contrario S. Thyphimurium, S. Cholerasuis o S. Derby entre otros, sí serían capaces de encontrarse en forma endémica en diferentes rebaños animales (Gómez-Laguna *et al.*, 2010).

Los serovares aislados desde animales, de acuerdo al informe de la OPS, señala que los más frecuentes fueron S. 4,12:d:-, S. Thyphimurium, S. Enteritidis y S. Infantis, siendo este último serovar uno de los más aislados también en nuestro estudio. En relación a la resistencia antibiótica, en nuestro estudio el análisis conjunto de los 9 serovares encontrados indica que la resistencia está presente en 6 de ellos y una MDR se encuentra en un 17,18% de las cepas. También se observó que S. Derby en cerdos fue identificado como MDR, pese a que en el año 2004 de acuerdo a la OPS, no presentó

resistencia frente a ninguno de los antibióticos utilizados, considerando que no fue aislado de animales sino de alimentos. También se señala que *S. Infantis* aislada de animales por la OPS, no presenta cepas MDR, que coincide con lo observado en las cepas analizadas en este estudio. La OPS indica que el serovar S.4,12:d:- presentó resistencia a ampicilina, cloranfenicol, amoxicilina-ácido clavulánico y ácido nalidíxico (OPS, 2005), es decir, para el año 2004 sólo se indica un serovar con MDR en animales, que difiere de lo analizado en el presente estudio, donde se presentaron 3 serovares con MDR, que apoya el hecho de un aumento de la resistencia en los aislados de *Salmonella spp.* en nuestro país. Datos recientes y preliminares en Canadá, indican que en cerdos los serovares más aislados desde casos clínicos fueron *S. Derby* y *S. Thyphimurium*, desde la granja *S. Derby*, *S. Infantis* y *S. Thyphimurium* var. 5-, desde matadero las mismas anteriores y *S. Worthington*. Todos estos serovares fueron también aislados en el presente estudio. Es importante destacar que de las 48 cepas obtenidas desde cerdos, 23 corresponde a *S. Infantis*. Este alto porcentaje de serovares aislados también es destacado por la CIPARS (Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance), en donde *S. Infantis* aislada desde granjas de cerdos supera ampliamente lo esperado (CIPARS, 2010). Al superarse los aislamientos esperados se supone un mayor riesgo asociado a los patógenos, sin embargo, en nuestro estudio no podemos extrapolar esta situación debido a que es un análisis de tipo pasivo, sólo con cepas aisladas de muestras que llegan a laboratorio. Pese a esto hay que señalar que *S. Infantis* no presentó ninguna cepa MDR.

Hay que considerar que de los 9 serovares aislados algunos son de origen silvestre, aislados a partir de gaviotas, las cuales pueden actuar como diseminadoras de estos agentes hacia otros animales, incluido el hombre, o bien hacia alimentos. Recientemente se ha descrito un caso fatal de meningitis asociado a *S. Enteritidis* fagotipo 14b en un hombre de mediana edad sin

antecedentes de inmucompromiso (ÓhAiseadha *et al.*, 2010). La OPS (2005) indica que *S. Enteritidis* es el serovar de mayor frecuencia aislado en Chile y sólo se analizó el 20% de las cepas para determinar susceptibilidad antibiótica, no encontrándose cepas MDR. Dado que este mismo serovar fue el aislado en las gaviotas analizadas en el presente estudio, existe riesgo potencial de causar daño en la salud humana y es indispensable seguir vigilando la resistencia en este serovar.

Existen diversos factores externos que pueden introducir este patógeno en las explotaciones animales, tales como aves, roedores, otros animales de abasto, humanos, agua y los alimentos utilizados en ellas. Por esto la actual demanda de los consumidores sobre la industria alimentaria es la exigencia de alimentos seguros e inocuos, lo que ha llevado a un aumento del control de *Salmonella* y otros patógenos en animales. Esto debido a que *Salmonella* puede aislarse en una amplia variedad de alimentos destinados a los animales, tanto de origen vegetal y sobretodo animal. Productos de naturaleza proteica como las harinas de carne-hueso y las harinas de pescado se asocian a una mayor tasa de contaminación por *Salmonella*, esto se ha visto en diversos estudios como el de la FDA en donde en 1993 se aisló *Salmonella* en el 56,4% de los ingredientes de origen animal (Creus, 2005).

Dado que en la actualidad se ha prohibido el uso de ingredientes de origen animal es que se puede inferir que el riesgo asociado a estos alimentos ha disminuido considerablemente y son otras las vías de contaminación hacia el ser humano u otros animales. Los aislamientos del presente estudio sólo se enmarcan en alimentos destinados a consumo animal en que la resistencia antibiótica no mostró cepas MDR, pero sería interesante analizar también los animales expuestos a esos alimentos para determinar serovares y resistencia antibiótica que pudiesen presentar, para aportar así antecedentes epidemiológicos de factores asociados a la resistencia. En general, serovares

como *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Livingstone, *Sallmonella* Derby y *Salmonella* Anatum son los más aislados en materias primas o piensos y sólo afectan esporádicamente a los animales y al hombre. Aún así, algunos de estos serovares también se han relacionado como causantes de infecciones subclínicas en los animales. En el caso del porcino, *Salmonella* Anatum, aislada en varias ocasiones en piensos, corresponde a uno de los serovares encontrado con mayor frecuencia en granjas de reproductoras de Cataluña (Mejía, 2003). Se describe que *Salmonella spp.* ha sido aislada principalmente desde cerdos sanos que llegan a matadero, es decir, desde animales clínicamente sanos. Los porcentajes de cuadros de salmonelosis en cerdos no serían tan altos pese a encontrarse un alto porcentaje de granjas positivas a *Salmonella enterica*, en Estados Unidos se describe del orden de 38,2% (Bahnson, 2006).

Un estudio en Inglaterra logró detectar 263 serovares de *Salmonella* desde alimentos destinados a consumo animal y desde el ganado; se observó que el 14,1% de los aislados fue resistente al menos a un antibiótico y que un 1,9% fue multiresistente (Papadopoulou *et al.*, 2009). En el presente estudio la multiresistencia fue mucho más alta, tal como se señaló anteriormente, lo que indicaría que se requiere de un control más estricto para evitar esta elevada resistencia. Papadopoulou *et al.* (2009), señalan en su estudio que no existe evidencia de asociación estadística entre los 10 serovares más aislados desde alimento y ganado. Esto apoya la teoría que los genes de resistencia pueden ser adquiridos desde el tracto digestivo del ganado ya que éste es el mayor reservorio bacteriano, y desde donde las cepas resistentes pueden ser diseminadas (Acar and Moulin, 2006).

De acuerdo al listado de los 20 serovares más comunes aislados desde humanos del NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria) (CDC, 2010) los dos primeros son *S. Enteritidis* y *S.*

Thyphimurium, otros autores señala a *S. Derby* como serovar aislados en ocasiones en humanos (Usera *et al.*, 2003), correspondientes todos a serovares aislados desde animales en nuestro estudio, también se observó que dos de los serovares aislados desde alimentos destinados a consumo animal, *S. Derby* y *S. Infantis*, fueron aislados desde cerdos cuyo destino final es ser consumidos por humanos, por lo que se puede inferir que el hecho que alimentos destinados a consumo animal tengan el patógeno puede aumentar el riesgo que el producto de origen animal también lo tenga y de esa manera llegar al ser humano.

La SVARM (Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring) indica que el 46% de los aislados del periodo 2000-2009 desde animales de producción corresponde al serovar *S. Thyphimurium*, el 14% de ellos fue resistente al menos a un antibiótico y las cepas MDR se presentaron en el periodo 2004-2008. En nuestro estudio el 22% de las cepas fue MDR durante el periodo 2007-2009. Desde la perspectiva de salud pública la resistencia en las especies productivas pasaría a ser más importante que la observada en vida silvestre o mascotas (SVARM, 2009).

Los diferentes serovares aislados en este estudio corresponden a serovares no tifoideos de *S. enterica*, que pueden aceptarse como de origen zoonótico adquiriendo su resistencia en el huésped de origen animal y luego llegan al ser humano a través de la cadena alimentaria (Threlfalla, 2002), esta teoría ya está siendo aceptada en países desarrollados. En los últimos años se ha producido un considerable aumento de cepas resistentes a antimicrobianos, lo que parece estar correlacionado, al menos en parte, con el uso de estas moléculas en animales destinados a consumo, ya sea como promotores de crecimiento, como parte de su alimentación o como parte de un tratamiento inadecuado frente a diversas infecciones. Es por esto que cepas de origen alimentario o animal, que son resistentes a diferentes grupos de antibióticos, tal

como lo observado en las cepas analizadas, pueden traspasarse a la flora intestinal de otras especies animales. Los antibiogramas dieron como resultado un alto porcentaje de resistencias entre las cepas de *Salmonella* analizadas. La resistencia más comúnmente detectada fue para Oxitetraciclina con un 44,17% cifra similar a la detectada por Alaniz *et al.*, (1997) que alcanzaba un 57,4% en *Salmonella* de origen animal. Ruiz *et al.*, (2006) señala porcentajes de resistencia a tetraciclinas mucho más bajos, alcanzando sólo un 3,3% pero en aislados de aves clínicamente sanas. En el presente estudio los aislados provienen del Laboratorio de Microbiología Veterinaria y se debe considerar que pueden proceder de animales enfermos que pudieron haber recibido tratamientos antibióticos. Para amoxicilina, la resistencia de *Salmonella* encontrada por Zamora *et al.*, (2006) en muestras de alimento fue de un 15% cifra que también se acerca al valor obtenido en el presente estudio donde la resistencia fue de un 11,8% pero desde muestras de origen animal.

En seres humanos la salmonelosis suele ser un proceso auto limitado, quedando confinado al tracto gastrointestinal, por lo cual la terapia antimicrobiana no está indicada. Sin embargo en el caso de pacientes inmunodeprimidos o niños resulta de vital importancia contar con tratamientos efectivos. Además en el tracto gastrointestinal, donde la diversidad bacteriana es muy elevada, *Salmonella* puede mediar la transferencia horizontal de determinantes de resistencia a la microbiota normal que puede llegar a actuar como patógenos oportunistas y/o permitir la propagación de resistencia a otros patógenos que interaccionen con ella. Por tanto, el incremento de la resistencia en serovares de *S. enterica* se ha convertido en un importante problema de salud pública (Zhao *et al.*, 2007)

También es importante destacar que se encontró resistencias a flumequina, ceftiofur y sulfadiazina-trimetoprim. Algunos de estos compuestos, junto a las tetraciclinas, han sido utilizados por décadas en la producción animal, ya sea

como profilaxis o con fines terapéuticos, y en tratamiento de infecciones humanas por lo que su resistencia está ampliamente difundida (Breuil *et al.*, 2000). De acuerdo al informe del NARMS (CDC, 2010) la resistencia de *Salmonellas* no tifoideas frente a amoxicilina, ampicilina y ceftiofur están categorizadas por la Organización Mundial de la Salud con importancia crítica, mientras que sulfas, tetraciclina y fenicoles son de alta importancia. De este modo, en humanos, las principales resistencias dentro de estos grupos se presentan en ceftiofur (2,9%), ampicilina (9,6%), sulfizoxasole (10%) y tetraciclina (11,5%). Tal como se señaló anteriormente, en el caso de tratar una gastroenteritis por *Salmonella* se recomienda amoxicilina o trimetoprim-sulfametoxazol, pero debido a los niveles de aumento de resistencia las recomendaciones se han modificado orientándose a cefalosporinas de amplio espectro o fluoroquinolonas (CDC, 2010).

Los rangos de CMI observados en este estudio superan ampliamente algunos parámetros indicados por SVARM (2009), como Florfenicol en que encontraron un 1,7% de resistencia mientras que en nuestro estudio se observó un 60% de resistencia. Para tetraciclina SVARM encontró un 5,1% de resistencia en comparación al presente estudio que indicó un 96,66%. Los RIC de las CMI presentados por las cepas analizadas frente a antibióticos como oxitetraciclina fueron bastante amplios, junto a una CMI<sub>90</sub> de 512 µm/mL que indica resistencia 32 veces mayor a lo establecido. Los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> no necesariamente son predictivos del éxito o falla de una terapia determinada, dado que al ser un estudio *in vitro* puede no tener relación con los resultados clínicos. El uso de la CMI<sub>90</sub> para determinar sensibilidad en patógenos puede ser de utilidad, pero es necesario establecer relaciones *in vitro- in vivo* para instaurar usos adecuados de antibióticos. Es por esto que los datos planteados por nuestro estudio pueden ser utilizados sólo como referencia en el uso de los antibióticos testeados.

La acumulación de la resistencia bacteriana a los antibióticos es una demostración de la afirmación de Darwin de la supervivencia del más apto, con graves consecuencias prácticas para el tratamiento de la infección. Patrones y mecanismos de resistencia han sido sometidos a evolución continua, por ejemplo, mientras la prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente se ha estabilizado en el Reino Unido otras resistencias están proliferando rápidamente, en particular las de las cefalosporinas y quinolonas entre las bacterias Gram negativas (Livermore, 2007). Lo mismo es aplicable al género *Salmonella* dado que se ha visto hoy en día la baja o nula efectividad de algunos antimicrobianos, que ha llevado al desarrollo de los fármacos de segunda o tercera generación.

Aunque existe controversia respecto a si es en el ambiente o en el humano donde se generan primordialmente las cepas resistentes, se reconoce que en ambos se dan condiciones para su surgimiento y persistencia. Dado que la resistencia se presentó en los aislados de origen animal y alimentarios, este inconveniente ya se encuentra presente en todo nivel. Las consideraciones iniciales como empleo de dosis subterapéuticas de antimicrobianos en la dieta animal con fines profilácticos o para promover su desarrollo, es sólo una de las muchas causales que fomentan la aparición y diseminación de cepas resistentes en el medio ambiente y en la cadena alimentaria (Alaniz *et al.*, 1997). Es decir la teoría del origen de la resistencia sigue apuntando al origen animal que de acuerdo a datos del estudio puede corroborarse en el análisis de MCA aplicado en donde la agrupación de resistencia presentada es estrecha entre aislados de origen animal, por lo que el efecto observado, es decir, mantención y diseminación de cepas explicaría esta cercanía. Junto a esto se suma que existe una amplia variedad de serovares circulantes entre las diferentes especies animales, principalmente en cerdos en donde se detectó 7 diferentes serovares en el presente estudio.

La frecuencia de resistencia encontrada en este estudio y el riesgo potencial que existe de que estas cepas lleguen al hombre a través de la cadena alimentaria, destacan la necesidad urgente de reglamentar y vigilar el uso de antimicrobianos en la industria pecuaria así como mantener un seguimiento de este patógeno a fin de evaluar su comportamiento frente a los diversos agentes utilizados. Se considera que los genes de resistencia a antibióticos existían desde antes de introducirse los antibióticos en la práctica clínica. En las quinolonas es probable que mutaciones en el gen *gyrA* sean las principales responsables de la resistencia en aislados clínicos. La introducción y uso de los antibióticos actúa como fuerza selectiva. Un uso de antibióticos de una clase determinada, dentro de un intervalo distinto para cada especie bacteriana, hace que bacterias que han sufrido esos rarísimos eventos se seleccionen, por eliminación de sus compañeras sensibles al antibiótico. En ausencia de antibiótico se convertirían en muy minoritarias y en la mayoría de los casos tenderían a desaparecer. Al alcanzar una cierta importancia numérica la población resistente y el uso posterior de antibióticos favorece su extensión por eliminación de competidores sensibles. Una vez que se ha asentado la resistencia es difícil de erradicar (Alós y Carnicero, 1997).

Desde 1956 hasta hoy día la población mundial se ha duplicado y la esperanza de vida ha aumentado un 25-30%. O sea, somos más y vivimos más, entonces mantenemos una cantidad de bacterias mucho mayor a lo largo de la vida y, además, en los últimos años, una parte importante de éstas con determinantes de resistencia a antibióticos. Por tanto, la probabilidad de que surjan mutaciones, transposiciones, transformaciones o conjugaciones aumentan, confiriendo nuevas resistencias. En el mundo bacteriano existen las  $\beta$ -lactamasas, de espectro ampliado, que son capaces de inactivar las introducidas cefalosporinas de tercera generación, y se conocen también las enzimas IRT derivadas de las  $\beta$ -lactamasas a través de un número muy pequeño de mutaciones. Es por esto que antes de introducirse esos

antibióticos el mecanismo era casi funcional y por ello ha demorado muy poco tiempo en surgir y extenderse. También aumentan las probabilidades de que se añadan determinantes de resistencia a otros previamente existentes, dando lugar a cepas multiresistentes, posibilidad que en ausencia de uso de antibióticos era casi imposible, por simple cálculo de probabilidades. Suponiendo igualdad de virulencia, cuantas más cepas resistentes haya mayor probabilidad de que las infecciones estén causadas por éstas (Alós y Carnicero, 1997). El problema de la distribución global de bacterias MDR debe resolverse dirigiendo los mayores esfuerzos en prevención de la diseminación y así asegurar un efectivo tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales.

Se está estudiando el sinergismo entre el sistema inmunitario y las aminopenicilinas frente a agentes como *S. pneumoniae*, lo que podría considerarse una estrategia para superar la resistencia de estos y otros agentes bacterianos (Aguilar *et al.*, 2005) apoyados en estudio de la farmacodinamia dado que los  $\beta$ -lactámicos pueden modular la virulencia.

El impacto económico que pueden causar las resistencias antimicrobianas es grande pero son muchas las variables y perspectivas involucradas, por ejemplo está el punto de vista médico, de los pacientes, el negocio del cuidado de la salud, la industria farmacéutica y el público. Se necesitan mejores métodos para evaluar las implicaciones prácticas desde todas estas perspectivas. Dado que los estudios realizados hasta la fecha se han visto obstaculizados por su pequeño tamaño y falta de uniformidad, la validez de la información proporcionada no es clara y la extrapolación de los estudios regionales o nacionales e internacionales es cuestionable. Se requieren estudios poblacionales sobre el impacto real de la resistencia, con un tamaño suficiente y adecuado, lo que sería útil para ayudar a abordar la problemática de las diferentes perspectivas y detectar la verdadera magnitud de las repercusiones

económicas de la resistencia a los antimicrobianos. El impacto general de la resistencia a los antimicrobianos de drogas merece más atención, tanto por parte del gobierno como de los profesionales del área (McGowan, 2001).

En nuestro país junto a la participación en la Red de Vigilancia de Resistencia a los Antibióticos de la OPS que es coordinado por el Departamento de Bacteriología, ISP, Ministerio de Salud; desde finales del año 1997 existe un Programa Nacional de Resistencia (PRONARES) que trabaja en la vigilancia de un número importante de cepas de origen humano (Trucco *et al.*, 2002). Otra fuente de obtención de datos de resistencia en Chile es la Red SENTRY que trabaja con algunos datos hospitalarios, lo que disminuye la representatividad de sus cifras. En el año 2002 la Sociedad Chilena de Infectología en conjunto con el ISP implementan una Red Nacional para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos. Junto a esto se continúa con la restricción en el uso de antimicrobianos iniciada en septiembre de 1999 (García, 2003). Pese a esto, faltan aún identificar los aislados de *Salmonella spp.* de origen animal y ambiental que pueden ser multiresistentes a drogas y diseminar la resistencia bacteriana. Es importante lograr identificar aquellas bacterias que diseminan la resistencia con mayor velocidad, y el mecanismo por el cual lo hacen, además de continuar con la investigación en el ámbito nacional para aislados de diversos orígenes (García, 2003).

Dado que el presente estudio es uno de los pocos dedicados a la caracterización de *Salmonella enterica* en el país, entrega una visión de la susceptibilidad antimicrobiana presentada por los aislados de origen animal y alimentario de forma transversal, pero como es un muestreo a conveniencia, es necesario seguir realizando estudios de este patógeno, representativos a nivel poblacional, para ir evaluando la evolución de la resistencia presentada. Junto a esto es importante además contar con pruebas basadas en técnicas moleculares para detectar segmentos de ADN que codifican resistencia a fin de

aportar mayor información para la caracterización y genotipificación de los aislados de *Salmonella spp.* en nuestro país.



## VII. CONCLUSIONES

1. El 54,38% de los aislados presenta resistencia a uno o más de los antibióticos utilizados en el estudio con un 17,18% de MDR. Además, los valores de CMI encontrados para los distintos antibióticos son mayores a los valores mínimos que definen la resistencia según la CLSI.
2. El 90,9% de los patrones de MDR provienen de cerdos.
3. El serovar S. GRUPO E (3,9:-:-), tiene mayor probabilidad de ser resistente a oxitetraciclina. No se demostró asociación entre el tipo de resistencia y el origen de la cepa de *Salmonella*.



## VIII.REFERENCIAS

1. Acar, J.F. and G., Moulin. 2006. Antimicrobial resistance at farm level. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 25 (2): 775-792
2. Aguilar, L., Giménez, M.J., Casal, J. y J., Prieto. 2005. Farmacodinamia de los betalactámicos y su modificación por el sistema inmunitario. Rev. Esp. Quimioter. 18(1): 80-82.
3. Alaniz, R.O., Ibarra, M.L.R., Barbosa, B.T.R. y A.L.J., Morales. 1997. Resistencia a antimicrobianos de cepas de Salmonella aisladas de fuentes animales. Vet. Méx. 28:215-220
4. Alexandre, M., C., Pozo y V., González. 2000. Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. Rev. Méd. Chile 128 (10):1075-1083.
5. Allerberger, F., Guggenbichler, J.P., Fille, M. and E., Semenitz. 1986. Septic disease picture in Salmonella infections. Immun. Infekt. 14: 199-202.
6. Allerberger, F., Liesegang, A., Grif, K., Prager, R., Danzl, J., Höck, F., Öttl, J., Dierich, M.P., Berghold, C., Neckstaller, I., Tschäpe, H. and I., Fisher. 2002. Salmonella enterica serovar Dublin en Austria. Euro. Surveill. 7(4):65-70.
7. Alós, J.I. y M., Carnicero. 1997. Consumo de antibióticos y resistencia bacteriana a los antibióticos: algo que te concierne. Med. Clín. 109: 264-270.
8. Álvarez-Fernández, M., Rodríguez-Sousa, T., Brey-Fernández, C., López-Meléndez y L., Piñeiro. 2003. Asociación entre integrones de clase 1 con resistencia a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*. Rev. Esp. Quimioter. 16 (4): 394-397.

9. Alvseike, O. and E., Skerve. 2002. Prevalence of a *Salmonella* subspecies *diarizonae* in Norwegian sheep herds. *Prev. Vet. Med.* 52(3-4):277-285.
10. Angulo, F.J., V.N., Nargund and T.C., Chiller. 2004a. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 51(8-9):374-379.
11. Angulo F.J., J.A., Nunery and H.D., Bair. 2004b. Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Rev. Sci. Tech.* 23(2):485-96.
12. Bahnson, P.B., Fedorka-Cray, P.J., Ladely, S.R. and Mateus-Pinilla N.E. 2006. Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. *Prev. Vet. Med.* 76: 249-262.
13. Beauchat, L.R. and T.J., Montville. 1997. Food fundamentals and frontiers. Editado por Michael P. Doyle.
14. Biberstein, E.L. and Y.C., Zee. 1994. Tratado de microbiología veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
15. Breuil, J., Brisabois, A., Casin, I., Armand-Lefevre, L., Frémy, S. and E., Collatz. 2000. Antibiotic resistance in salmonellae isolates from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 965-971.
16. Brisson-Nöel, A., Arthur, M. and P., Courvalin. 1988. Evidence for natural gene transfer from Gram-positive cocci to *E. Coli*. *J. Bacteriol.* 170: 1739-1745.
17. Cancho, B., M. S., García and J. Simal. 2000. The Use Of Antibiotics In Animal Feeds: An Actual Perspective. *Cienc. Tecnol. Aliment. Int.* 3(1): 39-47.
18. CDC (Center for Disease Control). 1982. Multirresistant *Salmonella* and other infections in adopted infants from India. *MMWR (Morb Mortal Wkly Rep)* 31: 285- 287.

19. CDC (Center for Disease Control). 2010. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2008. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services.
20. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS). 2010. Quarterly Summary: Salmonella in Agri-food Q1 2010: January- March 2010. Government of Canadá.
21. Cloeckart A., S. Baucheron, G. Fraujac, S. Schwarz, C. Kehenberg, J.L. Martel, and E. Chaslus-Dancla. 2000. Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance Encoded by the *floR* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2858-2860.
22. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard- third edition. 28(8).
23. Cona, E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev. Chil. Infect.* 19(2): 77-81.
24. Craven, S., N. Stern, E. Line, J. Bailey, N. Cox, P. Fedorka-Cray. 2000. Determination of the incidence of *Salmonella. Spp., Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* in wild birds near Broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. *Avian Dis.* 44: 715-720.
25. Creus, E. 2005. Salmonella en la Alimentación animal (I): Contaminación en material primas y piensos. *Albéitar* 85 (Mayo).
26. Doi, Y. and Y., Arakawa. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clín. Infect. Dis.* 45(1): 88-94.
27. Donaldson S.C., Straley B.A., Hegde N.V., Sawant A.A., DebRoy C., and Jayarao B.M. 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (6): 3940–3948.

28. Doublet, B., Schwarz, S., Kehrenberg, K. and Cloeckaert A. 2005. Florefenicol resistance gene *floR* is part of a novel transposon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(5):2206-2108.
29. Echeita, A., Aladueña, R., Gonzalez-Sanz, R., Diez, M., de la Fuente, F., Cerdán, M., Arroyo y R., Gutierrez. 2005. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (I). *Boletín Epidemiológico de España* 13(7): 73-84.
30. EFSA, 2008. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. Annexes. *The EFSA Journal* 135: 1-111.
31. Engberg, J., F.M., Aarestrup, D.E., Taylor, P., Gerner Smidt and I., Nachamkin. 2001. Quinolone and Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: Resistance Mechanisms and Trends in Human Isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 7(1): 24-34.
32. FDA Bacteriological Analytical Manual, 8<sup>th</sup> Edition. 1995. Chapter 5. *Salmonella*. En: *Food Borne Pathogens Monograph Number 1 Salmonella*. 1997. Oxoid.
33. FDA Consumer Health Information/U.S. Food and Drug Administration. 2010. En línea: [<http://www.fda.gov/consumers>]
34. Fica, A., M., Alexandres, S., Prat, A., Fernández, J., Fernández e I., Heitmann. 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. *Rev. Chil. Infect.* 18 (2): 85-93.
35. García, P. 2003. Resistencia Bacteriana en Chile. *Rev. Chil. Infect.* 20 (Supl 1): S11 - S23
36. Galimand, M., T., Lambert and P., Courvalin. 2005. Emergence and dissemination of a new mechanism of resistance to aminoglycosides in

Gram-negative bacteria: 16S rRNA methylation. Eurosurv. weekly releases 10 (1).

En línea: [<http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050127.asp#2>]

37. Gebreyes, WA. and C. Altiera. 2002. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Swine. J. Clín. Microbiol. 40(8): 2813–2822.
38. Ghadage, D.P. and A.M. Bal. 2002. Antibiotic Susceptibility Pattern of *Salmonella* worthington Isolated from Neonates – A Retrospective Study. Jpn. J. Infect. Dis. 55: 45-46.
39. Gledel, J. 1995. En: Microbiología Alimentaria. C.M. Bourgeoise, J.F. Mesclé y J. Zucca (eds.). 53-66. Ed. Acribia, Zaragoza.
40. Gómez-Laguna, J., Hernández, M., Creus, E., Echeita, A., Otal, J., Herrera-León, S. y R.J. Astorga. 2010. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs. In press: The Vet. J. doi:10.1016/j.tvjl.2010.09.009.
41. González-Acuña, D., Silva, F., Moreno, L., Cerda, F., Donoso, S., Cabello, J. y López J. 2007. Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. Rev. Chil. Infect. 24(3): 199-203.
42. González, G., S., Mella, R., Zemelman, H., Bello y M., Domínguez. 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. Rev. Méd. Chile. 132: 619-626.
43. Gopee, N.V., Adesiyun A.A., y Caesar K. 2000. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. J. Wildl. Dis. 36: 284-293.
44. Gracey M., Iveson J.B. y Suharyono S. 1980. Human *Salmonella* carriers in a tropical urban environment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 479-82.

45. Hammack, T., P., Sherrod, V., Bruce, G., June, F., Satchell and W., Andrews. 1993. Poultry Sci. 72: 373-377.
46. Heisig P., Kratz B., Halle E., Graser Y., Altwegg M., Rabsch W. and Faber J.P. 1995. Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. Microb Drug Res. 1: 211-218.
47. Helms, M., P. Vastrup, P. Gerner-Smidt and K. Molbak. 2002. Excess mortality associated with antimicrobial drug resistant *Salmonella typhimurium*. Emerg. Infect. Dis. 8 (5): 490-495.
48. Holmberg S.D, Osterholm M.H., Senger K.A. and Cohen M.L. 1984. Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. New Engl J Med. 311(10): 617-622.
49. Hooper, D.C. 2001. Emerging Mechanism of Fluoroquinolone Resistance. Em Infec Dis. 7(2):337-341.
50. Ibar, M.P., G.Vigo, P., Piñeyro, M.I., Caffer, P., Quiroga, C., Perfumo, D., Centrón y G., Giacoboni. 2009. Serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en porcinos de faena y su resistencia a los antimicrobianos. Rev Arg de Microb. 41: 156-162.
51. Kim, H.J., P., Si-Hong and K., Hae-Yeong. 2006. Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 and Non-LT2 *Salmonella* Genomic Sequences, and Genotyping of Salmonellae by Using PCR. App and Environ Microb. 72(9): 6142–6151.
52. Laconcha I., Baggesen D.L., Rementeria A. and Garaizar J. 2000. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6 y 8 isolated from animal and human resources in three european countries. Vet Microbiol. 75: 155-165. Lanz R., Kuhnert and P. Boerlin. 2002. Antimicrobial resistance and resistance gene determinant in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. Vet. Microbiol. 91:73-84.

54. Lauderdale, T.L., Frank M. Aarestrup, Pei-Chen Chen, Jui-Fen Lai, Hui-Ying Wang, Yih-Ru Shiau, I-Wen Huang and Che-Lun Hung. 2006. Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. *Diagn Microb and Infec Dis.* 55 : 149–155.
55. Le Minor, L. 1984. Genus *III*. *Salmonella* Lignières 1900, 389<sup>AL</sup>. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, NR., Holt, JG. Vol. 1. Williams & Wilkins, U.S.A.
56. Lees, P. y F., Shojaee Aliabadi. 2002. Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Botana López, L.M., Landoni, M.F y Martín-Jiménez, T. Editorial McGraw Hill/Interamericana de España, S.A.U.
57. Lemos, M.L. 2002. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Botana López, L.M., Landoni, M.F y Martín-Jiménez, T. Editorial McGraw Hill/Interamericana de España, S.A.U.
58. Lipsitch M., Singer R. and Levin B. 2002. Antibiotics in agriculture: When is time to close the barn door?. *PNAS* 99 (9): 5752-5754.
59. Livermore, D. 2007. The zeitgeist of resistance. *J of Antim Chem.* 60(1), 59-61.
60. McGowan, J.E. 2001. Economic Impact of Antimicrobial Resistance. *Em Infect Dis.* 7 (2): 286-292.
61. Martín-Jimenez, T. 2002a. Sulfonamidas y diaminopirimidinas. En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Botana López, L.M., Landoni, M.F y Martín-Jiménez, T. Editorial McGraw Hill/Interamericana de España, S.A.U.
62. Martín-Jimenez, T. 2002b. Antimicrobianos que actúan en la pared bacteriana. En: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Botana López, L.M., Landoni, M.F y Martín-Jiménez, T. Editorial McGraw Hill/Interamericana de España, S.A.U

63. Mejía, W.J. 2003. Epidemiología de la Salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona.
64. Mossel, D.A., B. Moreno y C.B. Struijk. 2002. En: Microbiología de los Alimentos. 2ª Edición. Ed. Acribia, Zaragoza.
65. Muley VA, Pol SS, Dohe VB, Nagdawane RP, Arjunwadkar VP, Pandit DP, Bharadwaj RS. 2004. Neonatal outbreak of salmonella worthington in a general hospital. Indian J. Med. Microbiol. 22(1):51-53.
66. Nakamura S. 1995. Veterinay use of new quinolones in Japan. Drugs. 49 Suppl 2:152-158.
67. Natasi A. and Mammina C. 2001. Presence of Class I integrons in multidrug resistant low prevalence *Salmonella* serotypes, Italy. Emerg Infect Dis. 7(3): 455-458.
68. OPS/HDM/CD/A/408/06. 2005. Informe Annual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos-2004- Brasilia-Brazil 27 al 29 de julio.
69. Orden Gutiérrez, J.A. y de la Fuente López, R. 2001. Impact on public health of quinolone resistance in animal-origin bacteria. Rev Esp Salud Pública. 75(4): 313-320.
70. Otero, J.L., Mestorino, N. y J.O. Errecalde. 2001. Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte 1: Química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. Anal Vet. 21(1): 31-41.
71. Pacheco, J.C. 2002. La revista médica del C.I.E.M. Los Mecanismos de la Resistencia Microbiana. Vol. 1. En línea:  
[<http://www.ucsm.edu.pe/ciemucsm/larev/mecre.htm>]
72. Papadopoulou, C., Carrique-Mas, J.J., Davies, R.H. and A.R. Sayers. 2009. Retrospective analysis of Salmonella isolates recovered from animal feed in Great Britain. Vet. Rec. 165(23):681-688.

73. Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. C. Nightingale, R. Preston and J. Waddell. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* 53(1): 28–52.
74. Poirel, L., Guibert, M., Bellais, S., Naas, T. and P. Nordmann. 1999. Integron-and Carbenicillinase- mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistance *Salmonella enterica* serotype Thyphimurium DT 104 from French patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1098-1104.
75. Popoff, M., J., Bockemühl, and L., Gheesling. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Res in Microb.* 155: 568–570.
76. Prat, S., A., Fernández, A., Fica, J., Fernández, M. Alexandre e I., Heitmann. 2001. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella enteritidis* de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 9(1): 7-12.
77. Rabsch, W., B. Hargis, R. Tsois, R. Kingsley, K. Hinz, H. Tschäpe, A. Bäumlér. 2000. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. *Emerg. Infect. Dis.* 6 (5): 443-448.
78. Rice, L. B. 2000. Bacterial Monopolist: The Bundling and Dissemination of antimicrobial Resistance Genes in Gram Positive Bacteria. *Clinical Infectious Diseases.* 31: 762-769.
79. Rowe-Magnus D.A. and Mazel D. 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Genomics.* 565-569.
80. Ruiz M., Rodríguez J.C., Elfa M. y Royo G. 2000. Infecciones extraintestinales producidas por serovares no tifoideos de *Salmonella*. Experiencia de 9 años. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 18: 219-222.
81. Ruiz, J.D., Suárez, M.C. y C. Uribe. 2006. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Salmonella* spp. en granjas de ponedoras

- comerciales del departamento de Antioquia. Rev Colomb Cs Pec. 19(3).
82. Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S. and Mabilat, C. 1995. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Microb. Drug Resist. 1: 195-202.
83. Sandvang, D., FM, Aarestrup and LB, Jensen. 1997. Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. 157 (1): 177-181.
84. Sandvang D., Jensen L.B., Baggesen D.L and Baloda S.B. 2000. Persistence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clone in danish pig, production units and farmhouse environment studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). FEMS Microbiol. Lett. 187 (1): 21-25.
85. StataCorp. Stata Statistical Software/SE 10.0 for Windows: College Station, TX: 543 StataCorp. LP., 2007.
86. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM). 2009. National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden. Printed by Edita Västra Aros, Västerås, Sweden ISSN.
87. Swanson, S., C., Snider, C., Braden, D., Boxrud, A., Wünschmann, J.A., Rudroff, J., Lockett and K., Smith. 2007. Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Associated with Pet Rodents. The New Engl J of Med. 356 (1): 21-28.
88. Taddei F., Radman M., Maynard-Smith J., Toupance B., Gouyon P.H. and Godelle B. 1997. Role of mutator changes in adaptive evolution. Nature. 387: 700- 702.
89. Threlfalla, E.J. 2002. Antimicrobial Drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infection. FEMS Microbiol. Rev. 26: 141-148.

90. Toro, H., C., Saucedo, C., Borie, RE., Gough and H., Alcaíno. 1999. Status of free-living Pigeons in the city of Santiago. *Avian. Pathol.* 28:619-623.
91. Trucco, O., Prado, V., Durán, C. y Grupo PRONARES. 2002. Red de Vigilancia de Resistencia antimicrobiana PRONARES. Informe primer semestre 2001. *Rev Chil Infect*; 19 (Supl. 2): 140-148.
92. Usera, M.A., Rodríguez A., Echeita A. and R. Cano. 1998. Multiple analysis of a foodborne outbreak caused by infant formula contaminated by an atypical *Salmonella virchow* strain. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 17: 551-555
93. Usera, M.A., Aladueña, A., Días, R., De La Fuente, M., Cerdán, P., Gutierrez, R. y A. Echeita. 2003. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de origen humano en España en el año 2001. *Bol Epidem Sem. (España)* 11: 133-144.
94. Van den Bogaard A. E., R. Willems, N. London, J. Top and E.E. Stobberingh. 2002. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, farmers and poultry slaughterers. *J. of Antim. Chem.* 49: 497-505.
95. Villar, R.G., MD., Macek y S., Simons. 1999. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT 104 infections linked to raw milk cheese in Washington state. *J Amer Med Assoc.* 281: 1811-1816.
96. Vivanco, M. 1999. Análisis estadístico multivariable. Teoría y Práctica. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
97. Wall P.G., Morgan D. and Lamden K. 1994. A case control study of infection with an epidemic strain of multi-resistant *Salmonella typhimurium* DT 104 in England and Wales. *Com Dis Rep.* 4: R130-R140.

98. Wall P.G., Threlfall E.J., Ward L.R., and Rowe B. 1996. Multiresistant *Salmonella typhimurium* DT 104 in cats. A public health risk; Lancet: 348-471.
99. Webb, V. and J. Davies. 1993. Antibiotic Preparations Contain DNA: a Source of Drug Resistance Genes?. Antim Ag and Chem. 37 (11): 2379-2384.
100. Whiting, R.C., A. Hogue, W.D. Schlosser, E.D. Ebel, R.A. Morales, A. Baker and R.M McDowell. 2000. A quantitative process model for *Salmonella enteritidis* in shell eggs. J. Food Sci. 65 (5): 864-869.
101. Wray, R.M. and D.M., Davies. 2000. Control ambiental de *Salmonella*. Avicultura Profesional, 18 (5): 18-21.
102. Wright, GD. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv. Drug Del Rev 57: 1451-1470.
103. Yamane, K., J.i., Wachino, Y., Doi, H., Kurokawa and Y., Arakawa. 2005. Global Spread of Multiple Aminoglycoside Resistance Genes. Emerging Infectious Diseases, 11(6): 951-953.
104. Zamora, J.M., Chavez, C. y M.L. Arias. 2006. Comparación del Perfil de Sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. ALAN 56(2):
105. Zhao, S., P.F., McDermott, D.G., White, S., Qaiyumi, S.L., Friedman, J.W., Abbott, A., Glenn, S.L., Ayers, K.W., Post, W.H., Fales, R.B., Wilson, C., Reggiardo and R.D., Walker. 2007. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. Vet. Microbiol. 123: 122-132.

## IX. ANEXOS

**Tabla A.** Niveles de CMI de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos.

Cepas bacterianas	Antibióticos CMI (ug/mL)						
	Flu	Sul	Oxi	Flo	Amx	Cef	Enr
S. Derby	8	ND	256	ND	ND	ND	ND
S. Derby	32	ND	1024	ND	ND	ND	ND
S. Senftenberg	8	ND	64	ND	ND	16	ND
S. Senftenberg	512	ND	512	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Flu: Flumequina; Sul: Sulfadoxina; Tri: Trimetoprim; Oxi: Oxitetraciclina; Flo: Florfenicol; Amx: Amoxicilina; Cef: Ceftiofur; Enr: Enrofloxacino  
ND: no determinado.

**Tabla B.** Niveles de CMI obtenidos de *Salmonella enterica* aisladas de bovinos y equinos.

Cepas bacterianas	Antibióticos CMI (ug/mL)						
	Flu	Sul	Oxi	Flo	Amx	Cef	Enr
S. Thyphimurium (Equ.)	16	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Thyphimurium (Equ.)	8	ND	1024	ND	ND	ND	ND
S. Thyphimurium (Bov.)	16	256	ND	ND	ND	ND	ND
S. Thyphimurium (Bov.)	8	256	256	ND	ND	ND	ND
S. Thyphimurium (Bov.)	512	256	128	ND	512	ND	ND

Flu: Flumequina; Sul: Sulfadoxina; Oxi: Oxitetraciclina; Flo: Florfenicol; Amx: Amoxicilina; Cef: Ceftiofur; Enr: Enrofloxacino  
ND: no determinado.

**Tabla C.** Niveles de CMI obtenidos de *Salmonella enterica* aisladas de gaviotas.

Cepas bacterianas	Antibióticos CMI (ug/mL)						
	Flu	Sul	Oxi	Flo	Amx	Cef	Enr
S. Enteritidis	64	ND	128	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	256	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	256	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	512	ND	64	ND	ND	ND	ND
S. Enteritidis	512	ND	128	ND	ND	ND	ND

Flu: Flumequina; Sul: Sulfadoxina; Oxi: Oxitetraciclina; Flo: Florfenicol; Amx: Amoxicilina; Cef: Ceftiofur; Enr: Enrofloxacino  
ND: no determinado.

**Tabla D.** Niveles de CMI obtenidos de Salmonella enterica aisladas de cerdos.

Cepas bacterianas	Antibióticos CMI (ug/mL)						
	Flu	Sul	Oxi	Flo	Amx	Cef	Enr
S. Cholerasuis	128	ND	256	ND	ND	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	256	ND	512	ND	ND	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	512	ND	512	128	ND	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	128	ND	256	ND	512	16	2
S. GRUPO E (3,9;-;-)	1024	512	128	ND	512	ND	16
S. GRUPO E (3,9;-;-)	128	256	512	16	512	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	64	256	16	8	1024	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	32	64	64	ND	ND	16	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	512	ND	8	ND	ND	16	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	128	ND	16	ND	ND	16	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	512	ND	128	ND	ND	16	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	32	256	256	ND	1024	16	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	512	ND	16	ND	ND	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	128	ND	1024	ND	512	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	2	512	512	32	ND	ND	ND
S. GRUPO E (3,9;-;-)	128	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Thyphimurium	16	64	512	ND	ND	32	ND
S. Thyphimurium	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Thyphimurium	1024	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Thyphimurium	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Derby	64	512	256	64	1024	128	2
S. Derby	32	256	512	ND	ND	8	ND
S. Anatum	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	8	ND	512	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	128	ND	512	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	128	512	512	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	128	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	64	ND	512	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	128	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	64	512	128	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	16	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	512	ND	16	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	256	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	128	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	512	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Infantis	256	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S. Worthington	256	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Flu: Flumequina; Sul: Sulfadoxina; Oxi: Oxitetraciclina; Flo: Florfenicol; Amx: Amoxicilina; Cef: Ceftiofur; Enr: Enrofloxacin  
 ND: no determinado.