



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES**

**“Caracterización de integrones y casetes de resistencia a  
antimicrobianos y amino cuaternario en cepas de *Salmonella*  
aisladas en el Estado de México”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

**M en C. JORGE ANTONIO VARELA GUERRERO**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Junio 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

---

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES

**“Caracterización de integrones y casetes de resistencia a  
antimicrobianos y amino cuaternario en cepas de *Salmonella*  
aisladas en el Estado de México”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

**M en C. JORGE ANTONIO VARELA GUERRERO**

Tutor académico

Dr. Martín Talavera Rojas

Tutores adjuntos:

Dr. Edgardo Soriano Vargas

Dr. Jesús Vázquez Navarrete

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Junio 2016

## RESUMEN

*Salmonella* spp., es un problema en salud pública y salud animal, debido a la aparición de cepas multirresistentes a los antimicrobianos, esta multirresistencia se ha relacionado a genes de resistencia que se encuentran en el cromosoma bacteriano o relacionados con plásmidos, transposones y recientemente a integrones de resistencia; por lo que, el primer objetivo del estudio fue determinar la resistencia fenotípica y genotípica a los antibióticos de *Salmonella* spp. aislada de canales de bovinos sacrificados en rastros del Centro-Norte del Estado de México. Se determinó la presencia de los genes *PSE-1*, *tetG*, *qnrS*, *FloR*, *STR*. Los aislamientos en los que se identificaron estos genes presentaron resistencia a ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico, florfenicol y estreptomina; sin embargo, algunos aislamientos que presentaron los genes de resistencia, no expresaron resistencia fenotípica, este resultado se asoció principalmente a que algunos genes no contienen un promotor en su región codificante, lo que evita su expresión fenotípica; Por lo cual, el segundo objetivo del trabajo fue caracterizar el integron clase 1 de resistencia en aislamientos de *Salmonella* spp. de canales de bovino, ovinos y aves. El integron clase 1 se compone por dos regiones conservadas y una región variable en donde se encuentran diversos genes de resistencia denominados genes casete. La región 3'CS está compuesta por los genes *qacEΔ1* y *sul1*, estos genes confieren resistencia a compuestos amino cuaternarios y sulfonamidas respectivamente; sin embargo, se han identificado diferentes estructuras en esta región. Se analizaron 77 aislamientos de *Salmonella* spp. obtenidos de porcinos, aves y bovinos en rastros del Estado de México, México. El 40% de los aislamientos presentaron el integron 1, donde la

mayoría de estos aislamientos presentaron multirresistencia a antimicrobianos como estreptomina, ampicilina, tetraciclina, gentamicina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol. Los genes casete que se encontraron fueron *dfrA17*, *dfrA12* de resistencia a trimetoprim y los genes *aaA1*, *aaA2* y *aaA5* de resistencia a estreptomina. En la porción distal del integron clase 1 se identificaron los genes *qacEΔ1/sul1*; sin embargo, se observaron deleciones de uno o ambos genes, así como una región distal inusual compuesta por los genes *qacH* y *sul3* los cuales confieren la misma resistencia que los genes *qacEΔ1* y *sul1*; pero con diferente origen que aún no se ha explicado. Las diferentes estructuras genotípicas encontradas en el presente estudio nos indican que la evolución de las bacterias y su adaptación genética y fenotípica para sobrevivir son factores que ayudan a la aparición de variantes en los integrones, que podrían provocar que la terapia antimicrobiana y la desinfección no tengan los resultados esperados, incrementando la preocupación en la salud pública mundial.

Palabras clave: *Salmonella*, multirresistencia, integron, genes casetes.

## ABSTRACT

*Salmonella* spp, is a public and animal health problem, due to the emergence of multiresistant strains to antimicrobials, this multiresistance has been related to resistance genes that are found in the bacterial chromosome or related with plasmids, transposons and recently to integrons resistance; therefore, the first objective of the study was to determine the phenotypic and genotypic resistance to antibiotics of *Salmonella* spp. isolated from bovine animals carcasses sacrificed in slaughterhouses of the Center-North of Mexico State. The presence of *PSE-1*, *tetG*, *qnrS*, *FloR*, *STR* genes was determined. The isolates which identified these genes showed resistance to ampicillin, tetracycline, nalidixic acid, Florfenicol and streptomycin; however, some isolates that presented the resistance genes, did not express phenotypic resistance, this result was associated mainly to the fact that some genes do not contain a promoter in their coding region, which prevents its phenotypic expression; therefore, the second objective of this work was to characterize the class 1 integron of resistance in *Salmonella* spp. isolates of beef, sheep and poultry carcasses. The class 1 integron is composed of two conserved regions and a variable region where there are various resistance genes called genes cassette. The region 3'CS is composed of *qacEΔ1* and *sul1* genes, these genes confer resistance to quaternary amino compounds and sulfonamides respectively; however, variants have been identified for this region. We analyzed 77 isolates of *Salmonella* spp. obtained from pigs, poultry and cattle from slaughterhouses of the State of Mexico, Mexico. Forty percent of the isolates belonged to the class 1 integron, where the majority of these isolates showed

multidrug resistance to antibiotics such as streptomycin, ampicillin, tetracycline, gentamicin, chloramphenicol and trimethoprim-sulfamethoxazole. The cassette genes that were found, were *dfrA17*, *dfrA12* of resistance to trimethoprim and genes *aaA1*, *aaA2* and *aaA5* of resistance to streptomycin. In the class 1 integron distal portion, we identified *qacEΔ1/sul1*; however, deletions in one or both of them was observed, the same as an unusual distal region composed of *qacH* and *sul1* genes which confer the same resistance of *qacEΔ1* and *sul1* genes; but, with different origin that has not yet been explained. The different genotypic structures found in the present study indicate that the evolution of bacteria and their genetic and phenotypic adaptation to survive are factors that help the emergence of variants in the integrons, which could cause the antimicrobial therapy and disinfection does not have the expected results, by which increase the concern in global public health.

Key words: *Salmonella*, multidrug resistance, integron, genes cassettes.

## FINANCIAMIENTO

El presente trabajo formó parte del proyecto de investigación “Implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos (ETA’s)” con clave **UAEM 3182/2012U**, y recibió apoyo parcial del proyecto **SAGARPA CONACYT 2010-04-147499**.

## CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
DEDICATORIAS	vii
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	viii
AGRADECIMIENTOS PERSONALES	ix
FINANCIAMIENTO	X
CONTENIDO	Xi
ÍNDICE DE CUADROS	Xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	Xv
I.    INTRODUCCIÓN	1
II.   REVISIÓN DE LITERATURA	4
1. <i>Salmonella</i>	4
1.1. Historia	4
1.2. Características del género <i>Salmonella</i>	4
1.2.1. Características físicas	4
1.2.2. Características químicas	5
1.3. Clasificación del género <i>Salmonella</i>	5
1.4. Factores de virulencia	6
1.5. Patogénesis	7
1.6. Islas de patogenicidad	8
1.7. Islotes de patogenicidad	9
1.8. Epidemiología	9
1.9. Diagnóstico e identificación de <i>Salmonella</i> spp.	11
2. Antimicrobianos	13
2.1 Mecanismos de acción de algunos antimicrobianos.	13
2.1.1. Penicilinas	15

2.1.2. Aminoglucósidos	15
2.1.3. Tetraciclinas	15
2.1.4. Sulfonamidas	15
2.2. Resistencia bacteriana a antimicrobianos	16
3. Transposones	18
4. Plasmidos	22
5. Integrones	23
5.1. Integron clase 1	24
6. Mecanismos de transferencia de genes de resistencia.	26
7. Resistencia en <i>Salmonella</i> spp.	28
7.1. Resistencia a antimicrobianos	28
7.2. Resistencia a compuestos aminocuaternarios	29
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. HIPÓTESIS	33
V. OBJETIVOS	34
VI. MATERIALES Y MÉTODO	35
a. Aislamientos	35
b. Resistencia microbiana	36
c. Extracción de ADN	36
d. Amplificación de los genes de la integrasa clase 1	36
e. Amplificación de la región variable del integron clase 1	37
f. Amplificación de la región conservada 3' del integron clase 1	37
g. Purificación de ADN	38

h. Secuenciación	39
VII. RESULTADOS	40
1 Artículo Aceptado	40
2 Artículo enviado	47
VIII. DISCUSIÓN	67
IX. CONCLUSIONES	73
X. LITERATURA REVISADA	75

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Pruebas bioquímicas para la identificación del género <i>Salmonella</i> .	15
Cuadro 2.- Serovares del género <i>Salmonella</i> que se emplearon en el presente estudio.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sitios de acción de los fármacos antibacterianos de empleo corriente, que afectan a casi todos los procesos importantes en la célula bacteriana	14
Figura 2.- Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas de Unión a Penicilina (PUP)	17
Figura 3.- Estructura de transposones según contenido	19
Figura 4.-Esquema explicativo de la transposición conservativa.	21
Figura 5.- Esquema explicativo de la transposición no conservativa	22
Figura 6.- Estructura básica de los integrones	24
Figura 7.- Estructura del integron clase 1	25
Figura 8.- Mecanismos de transferencia de genes de resistencia, 1) Transformación, 2) transducción y 3) conjugación	28

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de antimicrobianos constituyó un acontecimiento sin precedentes, por la curación y control de infección bacterianas, lo cual ha permitido modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad de las infecciones bacterianas; sin embargo, en los últimos años, diferentes estudios mencionan la relación que existe entre el consumo de antibióticos como promotor de crecimiento en animales y el desarrollo de resistencia en microorganismos como *Salmonella* que afectan a humanos (Essen *et al.*, 2007).

La creciente resistencia a los antimicrobianos en aislados patógenos es de gran preocupación, debido a que los tratamientos empleados no tiene el efecto deseado, causando que la enfermedad siga afectando al organismo, esto es un problema crítico para la población que vive en países en vías de desarrollo donde existen altos porcentajes de enfermedades diarreicas las cuales se encuentran relacionadas con diversos patógenos bacterianos como *E. coli*, *Vibrio* y *Salmonella*; destacando que *Salmonella enterica* es una de las causas más importantes de enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo (Brenner *et al.*, 2000.)

Esta multiresistencia se ha relacionado con la presencia de genes de resistencia localizados en cromosomas como *TEM* y *Pse-1* de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, *tetA*, *tetB* y *tetG* de resistencia a tetraciclinas, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS* de resistencia a quinolonas, *FlorR* de resistencia a cloranfenicol o fluorfenicol y *sul1*, *sul2* y *sul3* entre otros (Beutich *et al.*, 2010; Faldynova *et al.*, 2003). Sin embargo, también se han identificado la presencia de genes de resistencia en plásmidos o transposones, los cuales facilitan la diseminación de dichos genes incrementando el riesgo en salud humana y animal. En 1990, se descubrió un elemento genético asociado a la resistencia que involucra la integración, por mecanismos de recombinación específica, de uno o varios genes de resistencia bajo control de un solo promotor. Este elemento se conoce como integron y constan de dos regiones conservadas y una región variable (Sabate y Parts, 2002) en donde son integrados diferentes

genes de resistencia denominados genes casete, generalmente un gen casete en su región codificante carece de promotor, lo que evita la transcripción de este gen; sin embargo, al ser integrado en la región variable del integron, éste lo provee de un promotor y de esta manera facilita la expresión de dicho gen (Bennett, 1999; Fluit y Schmitz, 1999; Recchia, 1995).

Existe una gran variedad de genes casete los cuales, codifican resistencia a diferentes antimicrobianos como ampicilina o  $\beta$ -lactamasa ( $Bla_{TEM}$ ), gentamicina y estreptomicina que pertenecen al grupo de aminoglicosido ( $aac_{Sat}$ ), trimetoprim ( $dfrA$ ), cloranfenico ( $Catb3$ ), tetraciclina ( $tet$ ), oxacilina ( $bla_{oxa}$ ) entre otros (Fluit y Schmitz, 1999; Centrón y Roy, 2002).

En la región conservada 5' del integron encontramos la integrasa, dos promotores y la región *attI*, la cual reconoce e integra los genes casete. En la región conservada 3' encontramos dos genes clásicos el *qacE $\Delta$ 1* y el gen *Sul 1* los cuales codifican la resistencia a compuestos de aminocuaternario y a sulfonamidas respectivamente (Gillings *et al.*, 2009.), sin embargo, desde el 2007 se reportó una región distal con otros genes (*qacH* y *sul3*), los cuales confieren la misma resistencia (Chuanchuen *et al.*, 2007).

Gran cantidad de estudios en el mundo han descrito la multiresistencia a antimicrobianos y desinfectantes relacionándola con la presencia de integron clase 1 en enterobacterias (Di conza y Gutkind, 2010). La presencia de dicho integron se encuentra en un promedio de 46% en cepas multirresistentes a nivel mundial y el integron 2 se encuentra en promedio de 8% en el mundo (Estrada *et al.*, 2005; Firoozeh *et al.*, 2011).

La resistencia a desinfectantes como compuestos amino cuaternarios, que son compuestos nobles y de primera elección como desinfectantes en rastros, plantas de alimentos, para uso en el hogar entre otros, se ha relacionado con la presencia del integron clase 1, debido a que en dicho integron se encuentran con frecuencia los

genes *qacEΔ1* o *qacH*, que codifican una bomba de eflujo evitando de este modo la acción de los compuestos aminocuaternarios (Chuanchuen *et al.*, 2008.), lo cual, hace que el microorganismo que contenga dicho integron sea muy difícil de eliminar. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo fue identificar los genes de resistencia presentes en el cromosoma (*tetG*, *FlorR*, *STR*, *qnrS*, *Pse1* y *sul1*), además, de caracterizar el integron clase 1 mediante la secuenciación de los productos de PCR obtenidos, así como la resistencia fenotípica a antimicrobianos en bacterias del género *Salmonella*.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 1. *Salmonella*

#### 1.1. Historia

El género *Salmonella* recibe su nombre en honor al microbiólogo americano Daniel Elmer Salmon (1850-1914), quien descubrió el germen designado como *Salmonella* en 1884, aislándolo del intestino de porcinos con diarrea (Su y Chiu, 2007) y fue ubicada dentro de la familia de las enterobacterias lactosa negativas (Brenner *et al.*, 2000).

Los microorganismos del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza, como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestre; aves y reptiles, en los cuales pueden llegar a producir una amplia gama de enfermedades (Gill, 2007). En medicina humana están descritas diversas presentaciones de salmonelosis: fiebre entérica, septicemia, y gastroenteritis; mientras tanto, en medicina veterinaria se ha determinado que esta bacteria puede provocar septicemia, enteritis aguda, subaguda y crónica, y abortos en diferentes especies animales (Stanchi, 2007). La *Salmonella* se transmite por contacto con animales enfermos y portadores sanos, aunque por lo general, la enfermedad producida por este agente microbiano tiene un origen alimentario, debido a la ingesta de alimentos contaminados con el patógeno; teniendo en cuenta que la fuente de contaminación ambiental es invariablemente la materia fecal (CDC, 2007).

La resistencia a los antimicrobianos se presentó desde hace más de 50 años, sin embargo, fue en 1989 cuando se empezaron a aislar cepas de muestras clínicas de humanos en el Reino Unido, las cuales presentaron resistencia fenotípica lo cual ha provocado gran preocupación en salud pública y animal (Reyes y Navarro, 1998).

#### 1.2. Características del género *Salmonella*

##### 1.2.1. Características físicas

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de este género son bacilos Gram negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5 µm, generalmente móviles por

flagelos peritricos, con excepción de *S. gallinarum*, y *S. pullorum* las cuales no cuentan con estos flagelos, son anaerobios facultativos, no esporulados. La temperatura máxima de crecimiento es alrededor de 45,6 °C. Sin embargo crece bien a la temperatura ambiente, pero lo ideal es a 37 °C. Se desarrolla en un rango de pH de entre 6,6-8,2 (Jawetz *et al.*, 2005).

### 1.2.2. Características químicas

El género *Salmonella* no fermentan la lactosa (excepto *S. enterica* subesp. *arizonae* y *S. entérica* subesp. *diarizonae*), fermentan glucosa con producción de gas (excepto *S. typhi*); no producen indol; no degradan urea; decarboxilan a la lisina y ornitina, reduce los nitratos a nitritos (Terragno *et al.*, 2003; Jawetz *et al.*, 2005).

### 1.3. Clasificación del género *Salmonella*.

A partir del descubrimiento del género *Salmonella* la clasificación taxonómica ha sido objeto de sucesivas modificaciones a través de los años. Sin embargo, todavía se siguen usando los métodos descritos y desarrollados por Le Mirror y Popoff, en la década de los 80s, donde definieron e identificaron cepas del género *Salmonella* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Su y Chiu, 2007 y Tindall *et al.*, 2005).

Estudios de DNA mediante técnicas de hibridación mostraron que 2 especies del género *Salmonella*: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*; están compuestas por 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Ezaki *et al.*, 2000). Sin embargo la clasificación en base al esquema establecido por Kauffman-White más de 2541 serovariedades, (Su y Chiu, 2007): Esta clasificación se basa en determinar los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y el antígeno de superficie o capsular (Vi) de algunos serotipos (Tindall *et al.*, 2005).

La serotipificación permite la identificación de los serotipos de *Salmonella* basados en exámenes antigénicos, estos bacilos poseen un antígeno somático (O), que es un lipopolisacárido termoestable localizado en la pared celular y un antígeno flagelar (H) que es una proteína termolábil contenida en los flagelos, ciertas especies poseen una

capa externa formada por polisacáridos que reciben el nombre de Vi (Reeves *et al.*, 1989).

Las células que poseen el antígeno Vi solo pueden ser aglutinadas por acción del anti-H o por anticuerpos anti-Vi, por lo que la aglutinación de tipo O solo se hace posible a través de la destrucción de los antígenos Vi y H (Brenner *et al.*, 2000).

Por medio de las reacciones de aglutinación H, O y Vi se han identificado más de 2541 (Su y Chiu, 2007). *Salmonella* se ha clasificado en grupos O, y han sido designadas las primeras 26 por letras (A-Z) y los subsiguientes por números, cada grupo posee su determinante O principal característico, según el esquema de Minor y Popoff en 1987 (Tindall *et al.*, 2005).

#### 1.4. Factores de virulencia.

Se conocen varios factores de virulencia, uno de ellos es la producción de al menos tres toxinas: las enterotoxinas que son sustancias liberadas al intestino y que ocasionan síntomas gastrointestinales como cólico y diarrea, las endotoxinas que hacen parte de la membrana externa de la bacteria y cuya actividad biológica está asociada con los lipopolisacáridos (LPS) y por último, las citotoxinas que están asociadas con la superficie celular, las cuales inhiben la síntesis proteica en la célula hospedadora y pueden estar implicadas en la adherencia a las células epiteliales, constituyendo esta última un segundo factor de virulencia de *Salmonella* (Salyers y Whitt 2002). También se ha descrito en algunas especies de *Salmonella* (*S. Typhimurium*) la formación de pseudópodos en la célula hospedadora, lo que trae como resultado la internalización de la bacteria en vesículas endocíticas; adicionalmente, la producción de adhesinas que incluyen fimbrias codificadas por el plásmido de virulencia pSLT, permite la unión de la bacteria a las microvellosidades de los enterocitos, fimbrias polares largas que se encargan de la unión de la bacteria a las placas de Peyer, y las fimbrias agregativas delgadas llamadas curli, que también pueden estar implicadas en la unión de las vellosidades de los enterocitos (Salyers y Whitt, 2002).

Otros factores relacionados con la Adherencia son los polisacáridos de superficie celular (O) y el antígeno Vi, un polisacárido capsular compuesto de ácido N-acetilglicosamin-urónico, el cual ayuda a prevenir la fagocitosis y puede proteger la bacteria de las formas reactivas de oxígeno al interior de los fagocitos, las cepas negativas para el antígeno Vi son menos infecciosas y virulentas que las positivas para este antígeno (Parry *et al.*, 2002).

La respuesta de tolerancia al ácido, es otro aspecto importante de la virulencia de *Salmonella* lo que permite a la bacteria atravesar el ambiente ácido del estómago, requisito necesario para la infección (Salyers y Whitt, 2002)

### 1.5. Patogénesis

La puerta de entrada es la vía oral, *Salmonella* debe sobrepasar la barrera defensiva representada por la acidez gástrica, posteriormente invade al hospedero a través de tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves.

El mecanismo de adherencia, se da por las adhesinas de la bacteria las cuales tienen una estructura que les permite reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores. En las bacterias se pueden encontrar una amplia variedad de adhesinas, las cuales se dividen en dos grupos: adhesinas fimbriales y adhesinas afimbriales (Humphries *et al.*, 2001).

En general, las adhesinas de las bacterias Gram negativas son: fimbrias, fibrilla, flagelos, lipopolisacaridos (LPS) y cápsula (Figueroa y Verdugo, 2005).

La adherencia de *Salmonella* al hospedero se da apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M (Figueroa y Verdugo, 2005).

En seguida de la adhesión se produce el mecanismo de invasión, el cual se ocasiona por un mecanismo conocido como disparo (Trigger). La bacteria envía señales a las células epiteliales que inducen rearrreglos del citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamiento (ruffling) en su superficie. Se reconocen varias proteínas efectoras de

la SPI-1 involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto: *SipA*, *SopE*, *SopE2* y *SopB* (Galán, 1996; Goosney *et al.*, 1999).

*Salmonella* puede invadir varias líneas celulares y se considera que puede estimular más de un camino de transducción de señales para promover su entrada a las células del hospedero (Srikanth, 2005).

Además éste bacilo produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes, tanto por la cara apical como por la basolateral, induce apoptosis en macrófagos activados y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, para poder ser transportada a hígado y bazo (Monack *et al.*, 2000).

#### 1.6. Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad se constituyen por un grupo de genes que codifican factores específicos de virulencia, su porcentaje de uniones de Guanina-Citocina difiere del promedio del genoma bacteriano (Marcus *et al.*, 2000).

Actualmente se sabe que la mayoría del género *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad; SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5 (Figueroa y Verdugo, 2005).

La SPI-1 se encuentra presente en *S. bongori* y todas las serovariedades de *S. entérica*, su porcentaje de G-C es del 42-47%; además, de que este islote de patogenicidad contiene los genes *inv/sap*, los cuales median la invasión de células no fagocíticas, apoptosis de macrófagos *in vitro*, activación de caminos AMP cinasa y factores de transcripción. La SPI-1 funciona en los primeros estadios de la invasión (Sánchez *et al.*, 2003; Figueroa y Verdugo, 2005).

La SPI-2 tiene un porcentaje de G-C del 46% y consta de 32 genes que regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los comportamientos intracelulares de fagocitos y células epiteliales (Figueroa y Verdugo, 2005).

La SPI-3 también interfiere en la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de  $Mg^{2+}$ , su porcentaje de G-C es del 39.8-49.3% (Marcus *et al.*, 2000).

La SPI-4 codifica un sistema de secreción de tipo I (SSTI) que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos (De Vinney *et al.*, 2000)

La SPI-5 tiene un porcentaje de G-C de 43.6%. Codifica proteínas efectoras involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria de la mucosa intestinal. Para el caso de la *Salmonella enterica* serovar Typhi, se reportaron diez islas de patogenicidad las primeras cinco fueron descritas anteriormente. La SPI-6 contiene el operón de la fimbria, la SPI-7 codifica la síntesis de cápsula (Ag Vi), la SPI-8 codifica bacteriosinas y una integrasa, la SIP-9 porta genes para la secreción de un SSTI y la SPI-10 contiene el fago 46 y el operón *SefA-R* (Parkhill *et al.*, 2001).

### 1.7. Islotes de patogenicidad

*Salmonella* requiere de otros genes para su virulencia que son bajos en G-C como el *pagC* y *msgA*, los cuales se localizan en el centisoma 25 del cromosoma de *S. enterica* serovar Typhimurium. Los genes *msgA*, y *PhoP* independientes, son necesarios para la sobrevivencia dentro del macrófago y virulencia. El operón *inviVI-AB* se localiza en el centisoma 7, otra posición del cromosoma de *Salmonella* se considera que está involucrado en la adhesión e invasión a las células del hospedero; a estos genes bajos en G-C se les conoce con el nombre de islotes de patogenicidad (Parkhill *et al.*, 2001).

### 1.8. Epidemiología

Uno de los agentes patógenos comúnmente asociados a alimentos contaminados por agentes bacterianos es *Salmonella*, junto con *E. coli* y *Shigella*. *Salmonella* constituye la segunda causa de morbilidad en países en vía de desarrollo, después de los procesos respiratorios, en donde la mayor parte de contaminación de los alimentos es de origen bacteriano (Gill, 2007).

La salmonelosis se considera como un problema en salud pública a nivel mundial y se puede manifestar mediante distintos síndromes que incluyen gastroenteritis, bacteriemia, fiebre tifoidea e infecciones localizadas en ciertas áreas del cuerpo. La manifestación más común de salmonelosis no tifoidea es una gastroenteritis de leve a moderada, con presentación de diarrea, dolor abdominal, vómito y fiebre. Los síntomas de gastroenteritis aparecen normalmente entre las 6 a 72 hrs después de ingerir alimentos contaminados con las bacterias. Los grupos sociales más susceptibles a esta enfermedad son los niños, los adultos mayores y las personas inmunocomprometidas, las cuales requieren de terapia antimicrobiana para superar la enfermedad (European Commission, 2004).

En años recientes los problemas relacionados con *Salmonella* han aumentado significativamente, en lo relativo a la incidencia y a la gravedad de los casos humanos. Varios países han apreciado un aumento de 20 veces en los años noventa comparado con los años ochenta. Algunos países han logrado limitar y aun revertir estos aumentos pero la propagación de dos cepas de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium están causando una mayor inquietud (Zaidi *et al.*, 2006).

La comunidad científica y las autoridades sanitarias asumen que en general, los pollos, cerdos y bovinos son los reservorios más frecuentes de *Salmonella*; que la ingestión de los alimentos contaminados es la causa más común de las infecciones en el humano; y que todas las serovariedades tienen el mismo grado de patogenicidad (Sarwari *et al.*, 2001).

En los Estados Unidos de América y el Reino Unido, se calcula que al año ocurren 1,412,498 y 73,193 infecciones por *Salmonella* no Typhi, respectivamente, y se estima que este patógeno es responsable de aproximadamente 30% de las muertes relacionadas a infecciones transmitidas por alimentos (Zaidi *et al.*, 2006). El costo aproximado por casos de salmonelosis humana en Estados Unidos de América es de 3 mil millones anuales y en Dinamarca asciende a 15.5 millones. Los datos relacionados con los costos de enfermedades transmitidas por los alimentos no se obtienen por lo general en los países en desarrollo.

En México, en un primer reporte se encontró que el serotipo más frecuente en los pacientes ingresados a los servicios de salud pública sin distinción de edad, fue *S. Typhimurium*, (Gutiérrez *et al.*, 2000). Estudiando una población de 300 niños que presentaban un cuadro de diarrea, se encontró que *Salmonella entérica* está asociada en un 53.5% de casos de niños menores de 12 años, sólo o en combinación con otros entero-patógenos. Los serotipos encontrados con mayor frecuencia fueron Ohio (28.3%), Typhimurium (16.3%), Infantis (8%), Anatum (0.6%), y Newport (0.3%) (Paniagua *et al.*, 2007).

En los Estados de Sonora, San Luis Potosí, Michoacán y Yucatán se aisló *Salmonella* en un 12.3% de 2,893 muestras de niños menores de 6 años con cuadros de diarrea y en un 5.3% de 6,685 muestras de niños asintomáticos. Los serotipos que se encontraron con mayor frecuencia fueron Typhimurium (22%) y Enteritidis (14.5%) encontrándose también los serotipos Agona, Muenchen, Oranienburg, Anatum, Newport y Meleagridis en menor proporción (Zaidi *et al.*, 2008).

En estudios realizados en canales de cerdos de rastros en el Estado de México se encontró una prevalencia de 16%, el serotipo más frecuente fue *Salmonella Typhimurium* en un 62% (Talavera *et al.*, 2007). En canales de cerdos de rastros del Estado de Hidalgo se encontró la presencia de *Salmonella* en un 31% y en canales de bovinos en un 11% (Hernández *et al.*, 2007). En el Estado de Yucatán se encontró la presencia de *Salmonella* en 10.2% en canales de cerdo, en 6.8% en canales de bovinos y en canales de pollos se encontró 4.6%; los serotipos que se encontraron con mayor frecuencia fueron *Salmonella Typhimurium* (22%) y *Salmonella Enteritidis* (14.5%) (Zaidi *et al.*, 2006).

#### 1.9. Diagnóstico e identificación de *Salmonella* spp.

Para el diagnóstico e identificación del género *Salmonella*, primero se debe de sembrar en un medio pre-enriquecido para enterobacterias los cuales según menciona la NOM-114-SSA1-1994 son caldo tetraionato, caldo selenito cistina o caldo peptonado al 10%, estos medios de pre-enriquecimiento se incuban durante 24 hrs a 37° C.

De los medios anteriormente mencionados se toma el cultivo y se siembra en medios selectivos para *Salmonella* spp como el agar Xilosa Lisina Desoxilato (XLD), agar verde brillante o agar *salmonella-shigella* entre otros, éstas placas se incuban durante 24hrs a 37° C (Terragno y Caffer, 2001).

La característica de las cepas de *Salmonella*, en los medios anteriormente mencionados son las siguientes:

En el medio Xilosa Lisina Desoxilato (XLD) las colonias de *Salmonella* se observan de color rosa o rojo que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras; para el caso del agar Verde Brillante (VB) las colonias de *Salmonella* son de color rojo o rosa que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido: en el caso del agar *Salmonella-Shigella* las colonias se muestran translucidas, ocasionalmente opacas, algunas colonias dan centro negro (NOM-114-SSA1-1994).

Teniendo la identificación en los medios selectivos para *Salmonella* se procede a la identificación bioquímica en donde deben de tomar dos colonias sospechosas y se siembran en agar triple azúcar hierro (TSI) y agar hierro lisina (LIA) estos se siembran con punción en el fondo y estriado en la superficie, se incuban a 37° C por 24 hrs (Hernández *et al.*, 2007)

La lectura o la reacción que da el género *Salmonella*, es el siguiente: en el caso del TSI se observa en el fondo de color amarillo (Acido) por la fermentación de la glucosa, en la superficie se observa un color rojo (Alcalino) más intenso que el medio original, debido a la no fermentación de la lactosa y la sacarosa; para el caso del LIA la reacción que se observa en todo el tubo es un color púrpura, debido a la descarboxilación de la lisina, las cepas que produzcan un fondo amarillo son consideradas negativas. La mayoría de las cepas de *Salmonella* generan ácido sulfúrico, en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción (Terragno y Caffer, 2001).

Las pruebas bioquímicas mencionadas anteriormente son las de mayor uso en la identificación de cepas de *Salmonella*, aunque, también existen otras pruebas bioquímicas que nos ayudan a diferenciar las especies y subespecies de este género, las cuales se describen en el cuadro 1 (Terrago y Caffer, 2001).

La identificación serológica constituye un importante complemento para la identificación de los serotipos del género de *Salmonella* y consiste en una reacción antígeno anticuerpo. Los antígenos pueden ser proteínas, hidratos de carbono y complejos de péptidos y carbohidratos, estos antígenos pueden ser componentes estructurales de la célula (pared, cápsula, fimbrias) o productos de excreción de la célula (exotoxinas, enzimas extracelulares). Debido a esto en los sueros inmunes se encuentran anticuerpos que reaccionan contra distintos determinantes antigénicos de la misma molécula (Su y Chiu, 2007).

La serotipificación para todas las enterobacterias es similar. Se basa en determinar la presencia de antígenos somáticos, flagelares y capsulares. En el caso de *Salmonella*, las serovariedades surgen como consecuencia de una asociación particular de factores antigénicos somáticos O y flagelares H (Hernández *et al.*, 2007).

En la actualidad existen sistemas de tipificación e identificación molecular como el RT-PCR, PCR de punto final, la fagotipificación que se emplean en estudios epidemiológicos y para identificar aislamientos con características definidas como multiresistencia o la virulencia (Yañez *et al.*, 2008; Espinoza *et al.*, 2007).

## 2. Antimicrobianos

### 2.1. Mecanismos de acción de algunos antimicrobianos

Los diversos sitios de acción de los fármacos antibacterianos caen dentro de cuatro categorías: inhibición de la síntesis de pared celular, daño de la función de la membrana celular, inhibición de la síntesis o función de ácidos nucleídos e inhibición de la síntesis proteica (Figura 1).

Cuadro 1.- Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Salmonella*.

Pruebas Bioquímicas	<i>S. enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>salamae</i> (II)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>arizonae</i> (IIIa)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>houtenae</i> (IV)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>indica</i> (VI)	<i>S. bongori</i> (V)
Dulcita	+	+	-	-	-	D	+
ONPG	-	-	+	+	+	D	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
Tartrato de lordan	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Silicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-(75%)	+(75%)	-	D	-

(Terragno y Caffer, 2001).

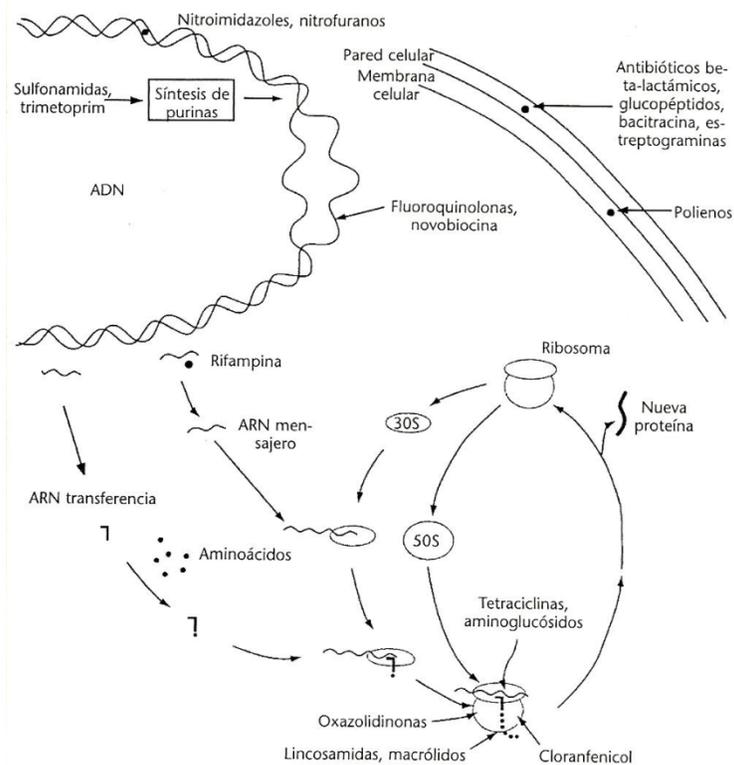


Figura 1.- Sitios de acción de los fármacos antibacterianos de empleo corriente que afectan a casi todos los procesos importantes en la célula bacteriana (Prescott *et al.*, 2002).

### 2.1.1. Penicilinas

Dentro del grupo de las penicilinas encontramos a la oxacilina, amoxicilina, meticilina y ampicilina, estos antimicrobianos son capaces de atacar bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared celular de la bacteria en sus últimas dos etapas (3 y 4), uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilina (o PBPs), lo que lleva a la destrucción de la pared y lisis celular (Prescott *et al.*, 2002).

### 2.1.2. Aminoglucósidos

Dentro del grupo de los aminoglucósidos encontramos a la neomicina, kanamicina gentamicina, estreptomicina, estos antimicrobianos son capaces de atacar bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su mecanismo de acción consiste en unirse a los receptores sobre la subunidad 30S ribosomal, desde donde induce una mala lectura del codo genético sobre el molde del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), inhibiendo de esta manera la síntesis proteica (Prescott *et al.*, 2002).

### 2.1.3 Tetraciclina.

Es un antimicrobiano bacteriostático que inhibe la síntesis proteica uniéndose de manera irreversible a los receptores de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano e interfiere con la fijación del ARN de transferencia aminoacil al sitio aceptor sobre el complejo ribosómico del ARN mensajero, esto ocasiona que los aminoácidos no sean agregados a la cadena de péptidos en elongación, bloqueando de esta manera la síntesis proteica.

### 2.1.4 Sulfonamidas.

El grupo de las sulfonamidas interfieren con la biosíntesis del ácido fólico en las células bacterianas impidiendo la formación competitiva que el ácido paraaminobenzoico (PABA) se incorpore dentro de las moléculas del ácido fólico (peteroilglutámico). Específicamente las sulfonamidas compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato sintetasa (Prescott *et al.*, 2002).

## 2.2. Resistencia bacteriana a antimicrobianos

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de estos y no solo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico. Desde principios de la era antibiótica los fenómenos de resistencia a estas sustancias han sido descritos (Wilson *et al.*, 2002).

La resistencia bacteriana puede ser natural cuando es una propiedad específica de algunas bacterias; o puede ser también adquirida, la cual se da por mutaciones cromosómicas adquisición de algún plásmido de resistencia, o algún integron es decir, un fragmento extracromosómico de ADN portador de genes que modifican la resistencia al antibiótico (Cordiés *et al.*, 1998).

La resistencia bacteriana se puede resumir en cuatro categorías:

1. Modificación enzimática del antimicrobiano: las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que pierda su funcionalidad, como se observa en la figura 2 (Tafur *et al.*, 2008).
2. Bombas de expulsión: Las bombas de expulsión han sido reconocidas por muchos años y están presentes en todas las células. Se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de las bacterias una gran cantidad de moléculas, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antimicrobianos. Para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético. El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula (Vila *et al.*, 2007).
3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: las bacterias generan cambios de la bicapa lipídica, esta permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son canales embebidos en la membrana externa de las bacterias Gram negativas que trabajan como filtros en una membrana permeable. Los cambios en su conformación pueden

llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Cavaco *et al.*, 2008).

4. Alteraciones del sitio de acción. Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos (Tafur *et al.*, 2008).

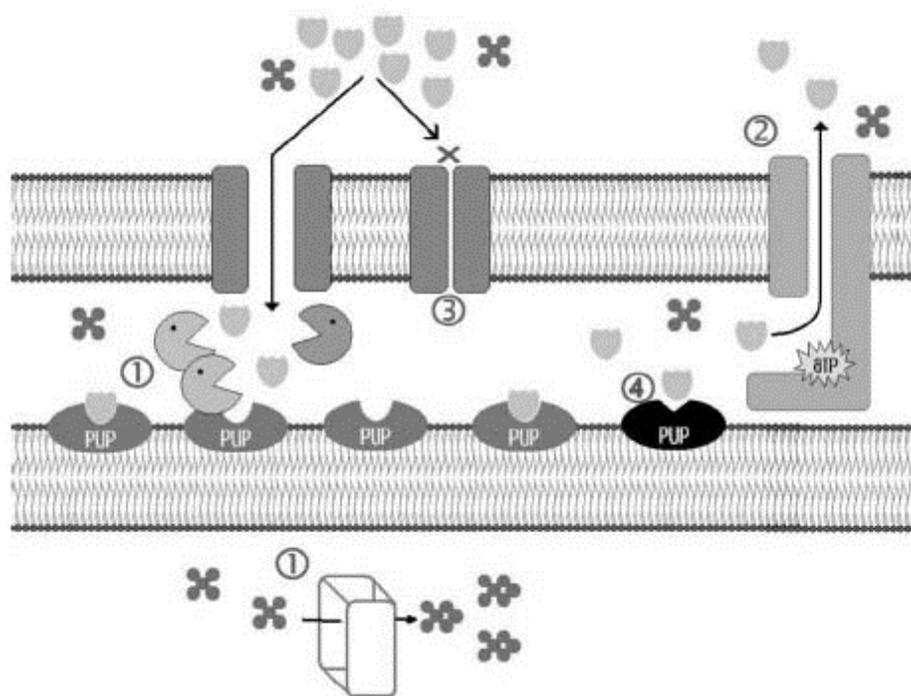


Figura 2.- Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas de Unión a Penicilina (PUP) (Tafur *et al.*, 2008).

Algunas especies bacterianas son naturalmente resistentes a una o más clases de agentes antimicrobianos. La adquisición de resistencia puede ser originada por el mismo microorganismo, mediante errores en la replicación del ADN, los cuales generan mutaciones que solamente se difunden verticalmente, es decir, serán transmitidas de célula madre a célula hija (Tenover, 2006)

Las bacterias también desarrollan resistencia a través de la adquisición de nuevo material genético de otros microorganismos resistentes, a la cual se le denomina transferencia horizontal y puede ocurrir entre cepas de la misma especie o entre diferentes especies o géneros bacterianos, los mecanismos de intercambio genético incluyen la conjugación, la transducción y transformación. A través de dichos mecanismos muchas bacterias han adquirido resistencia a múltiples clases de agentes antimicrobianos, lo que origina la resistencia a tres o más clases de fármacos antimicrobianos (Tenover, 2006).

### 3. Transposones

Los transposones o elementos genéticos transponibles son una secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, un fenómeno conocido como transposición. Los efectos de la transposición se habían descrito, indirectamente, mucho antes de conocer la fuente de los cambios fenotípicos observados, hablándose del fenómeno de variegación. Fue Barbara McClintock quien, a mediados del siglo XX, propuso la existencia de unos “elementos controladores” causantes de la inestabilidad cromosómica y la variegación que observabó en el maíz (McClintock, 1948), postulo que estos elementos se movilizaban entre múltiples genes, activando o reprimiendo la expresión de los mismos. Pero fue el genetista Alexander Brink quien acuñó el término de elementos transponibles, al considerarlo “menos interpretativo” (Feschotte y Pritham, 2007). Sin embargo, debieron pasar 20 años para que caracterizara molecularmente el primer elemento transposonible, una secuencia de inserción (IS) bacteriana de clase II. Desde entonces, se han caracterizado un enorme número de transposones en distintos organismos.

Existe una amplia diversidad de estos elementos genéticos móviles y pueden ser clasificados en base a su contenido, a su estrategia y mecanismo de transposición (Pritham, 2009).

Según su contenido se pueden clasificar de la siguiente manera:

Transposón simple, secuencia de inserción o elemento de inserción (IS): contienen una secuencia central con información para la transposasa, una enzima necesaria para la

transposición, y en los extremos una secuencia repetida en orden inverso. Esta secuencia repetida en orden inverso no es necesariamente idéntica, aunque muy parecida. Cuando un transposón simple se integra en un determinado punto del ADN aparece una repetición directa de la secuencia diana (5-12 pb) (Figura 3).

Transposón compuesto (Tn): contienen un elemento de inserción (IS) en cada extremo en orden directo o inverso y una región central con la transposasa que además suele contener información de otro tipo. Por ejemplo, los factores de transferencia de resistencia (RTF), poseen información en la zona central para resistencia a antibióticos como el cloranfenicol, la kanamicina, la tetraciclina, dándole una ventaja selectiva a las bacterias que lo posean (Figura 3).

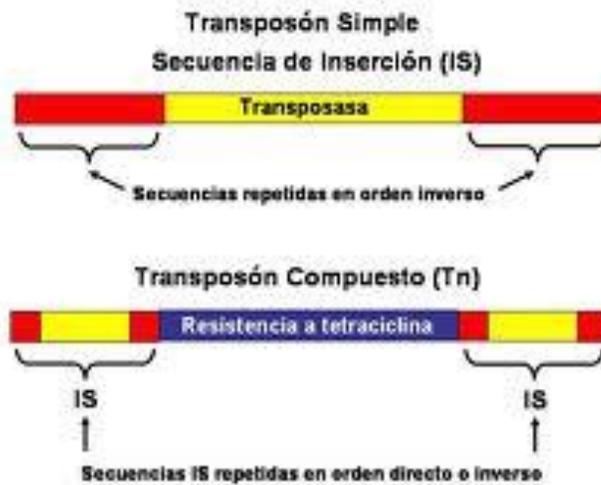


Figura 3.- Estructura de transposones según contenido (Kidwell, 2005).

Según estrategia de transposición se pueden clasificar de la siguiente manera

Clase I o retrotransposones: se mueven en el genoma siendo transcritos a ARN y después en ADN por retrotranscriptasa. A su vez, se clasifican en los de origen retroviral (retrotransposones con LTR) y de origen no retroviral (retrotransposones sin LTR) (Wessler, 2006).

Clase II o ADN transposones: se mueven directamente de una posición a otra en el genoma usando una transcriptasa para copiar y pegarse en otro locus del mismo (Wessler, 2006).

Clase III o MITE, por sus siglas en inglés “*Miniature Inverted-repeats Transposable Elements*” (Wessler, 2006).

Según el mecanismo de transposición se clasifica como a continuación se describe:

Transposición conservativa: el transposón sale de la sede donadora que queda vacía y se incorpora en una nueva sede receptora. No aumenta el número de copias del transposón en el interior de la célula (Wicker *et al.*, 2007).

Se expresa la transposasa, y realiza dos cortes de doble cadena a la misma altura en el genoma donante, dejando aislado el transposón. A continuación localiza una secuencia diana (pongamos, ATGCA) en el genoma aceptor, y realiza un corte cohesivo. Tras eso une los extremos a los del transposón aislado, y la ADN Polimerasa de la célula rellena las zonas de cadena sencilla dejadas en la secuencia señal tras el corte cohesivo. Debido a esto, la secuencia señal queda duplicada. Queda, sin embargo, un hueco en el genoma donante, que puede ser letal si no se repara. Realmente, en este caso se habla más de recombinación que de transposición (Figura 4) (Wicker *et al.*, 2007).

Transposición no conservativa: en este caso la transposasa realiza un corte cohesivo no solo en la secuencia diana, sino también en el genoma donante, dejando un corte a cada lado del transposón. A continuación integra todo el genoma donante con el aceptor, mediante un curioso mecanismo que forma un intermediario llamado “estructura entrecruzada”. Esta estructura es resuelta por una segunda enzima, la resolvasa, que según cómo lo resuelva, dará lugar a una de las siguientes transposiciones:

Transposición no replicativa: el genoma donante se libera, dejando el integrón en el genoma receptor. Al igual que en la transposición conservativa, queda un hueco en el genoma donante, que puede ser letal si no se repara.

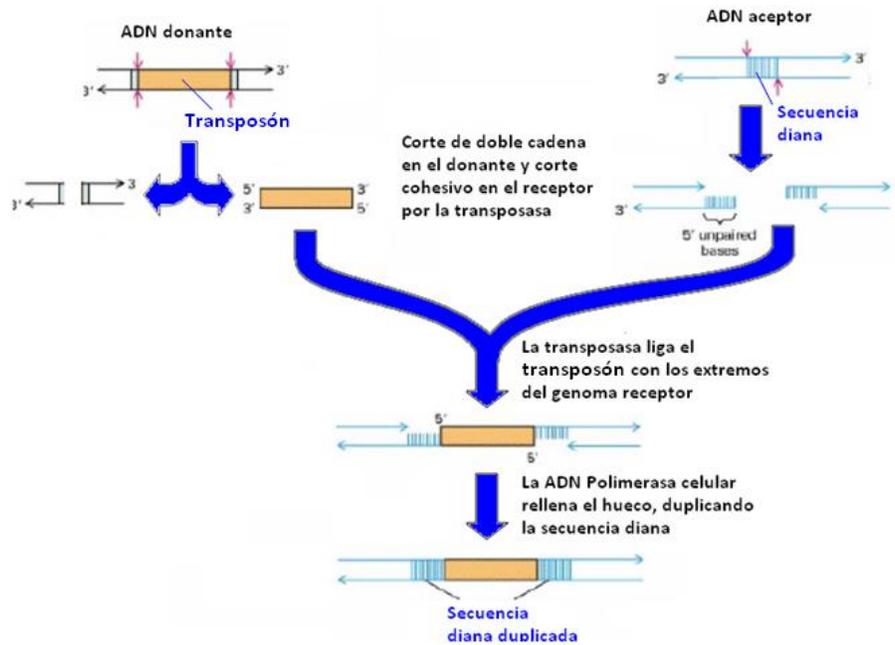


Figura 4.-Esquema explicativo de la transposición conservativa (Kidwell, 2005).

Transposición replicativa: se produce una replicación desde los extremos 3' del genoma aceptor, lo que acaba por duplicar el transposón, y produciendo un genoma mixto llamado “cointegrado”. A continuación la resolvasa rompe el cointegrado mediante una recombinación recíproca, que une los extremos del ADN aceptor original (ahora con una de las copias del integrón) y libera el genoma donante de nuevo con su transposón, (Figura 5) (Wicker *et al.*, 2007).

A diferencia de la conservativa, inicialmente no se integra solo el transposón, sino que se forma un híbrido con todo el genoma donante. Según el modo de resolución del enzima resolvasa, podrá dar lugar a una transposición replicativa, donde el genoma donante y receptor obtiene una copia del transposón o no replicativa (Figura 5).

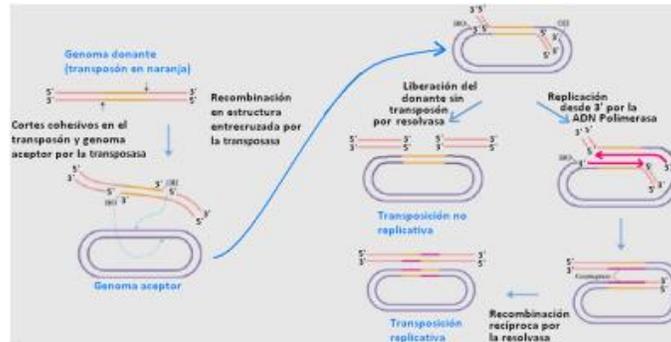


Figura 5.- Esquema explicativo de la transposición no conservativa (Wicker *et al.*, 2007).

#### 4. Plásmidos.

El término plásmido fue presentado por primera vez por el biólogo molecular norteamericano Joshua Lederberg en 1952. Los plásmidos, son moléculas circulares de ADN de doble cadena que constituyen una unidad de replicación independiente del cromosoma además de ser portadores de genes no esenciales para la bacteria (Lederberg, 1952)

Por esto pueden encontrarse más de una copia del mismo plásmido dentro de la célula bacteriana. En general los plásmidos de mayor tamaño, se encuentran en una o unas pocas copias, mientras que los más pequeños pueden estar en hasta 100 copias por célula (plásmidos multicopia). Si bien el ADN plasmídico no porta información genética esencial para la vida de la bacteria, sí portan genes que le confieren nuevas propiedades fenotípicas y que en algunos casos le son muy útiles para su adaptación al crecimiento en ciertos ambientes. Muchas bacterias potencialmente patógenas para el hombre, solo son capaces de comportarse como tales, cuando portan un plásmido en particular que contiene genes que le permiten expresar moléculas de adhesión a los tejidos del Huésped o sintetizar sustancias tóxicas para éste. En muchos casos, los plásmidos pueden ser determinantes de patogenicidad si codifican toxinas, o factores de virulencia; hay plásmidos sexuales que codifican los *pili* que permiten la transferencia de genes cromosómicos y los clásicos plásmidos R (determinantes de

resistencia) que codifican enzimas responsables de la resistencia en bacterias Gram negativas a los antibacterianos (Nikaido, 1998).

Los plásmidos pueden clasificarse según distintos criterios, por ejemplo por su tamaño en pares de bases (pb), su número de copias en la bacteria o por el tipo de genes que porta (plásmidos de virulencia, plásmidos de resistencia a antibióticos, etc.) También pueden clasificarse en grupos de incompatibilidad. Se dice que dos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad si son incapaces de coexistir en la misma célula bacteriana. Muchos plásmidos, en general los de mayor tamaño (que pueden portar hasta 50 o 100 genes), suelen ser capaces de transferirse de una bacteria a otra mediante un proceso llamado conjugación. Estos plásmidos de conjugación codifican todos los factores necesarios para su transferencia. Algunos plásmidos más pequeños, no conjugativos, pueden ser movilizados, es decir, que poseen la secuencia necesaria para permitir su transferencia, pero no codifican por ellos mismos las proteínas necesarias para ser transferidos. Por último, algunos plásmidos no se transfieren en absoluto. La adquisición de ADN plasmídico por una cepa bacteriana, puede realizarse por medios distintos a la conjugación, como transformación, transducción mediada por fagos o incorporación en el cromosoma (Chattoraj, 2000).

## 5 Integrones

Los integrones son piezas genéticas que participan en la captura y difusión de genes de resistencia entre las bacterias, estos elementos genéticos móviles, han sido reportados en Enterobacterias como *E. Coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. (Cabrera *et al.*, 2006). Los primeros integrones descritos fueron agrupados en clases (9 clases) de acuerdo con la secuencia nucleotídica del gen de la integrasa (*int1*). Los miembros de la clase 1, 2 y 3, codifican para genes de resistencia a los antibióticos y son los que se han reportado en enterobacterias (Sabate y Parts, 2002). Sin embargo, este sistema de clases se ha ido desdibujando debido a la gran divergencia de integrasas descritas en los diversos

microorganismos, lo que ha llevado a una clasificación práctica basada en una variedad de criterios, en dos grandes grupos:

- 1) El de los llamados integrones de resistencia a antibióticos (a veces denominados “integrones móviles”)
- 2) Los integrones presentes en el cromosoma bacteriano, denominados “superintegrones” (Boucher *et al.*, 2007; Fluit y Schmitz, 1999)

Del extremo 5´ al 3´ están formados por un fragmento que codifica una integrasa (*intI*) y a continuación una secuencia *attI* a la que se unen los genes de resistencia. Dentro del *intI* en su extremo 3´, hay una secuencia promotora  $P_{ant}$  a partir de la cual se transcriben los genes de resistencia integrados, ya que estos genes carecen de promotor (Sabate y Prats, 2002) (figura 6).

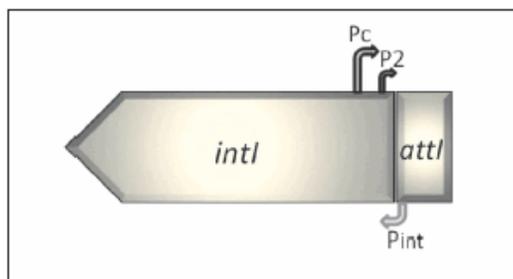


Figura 6.- Estructura básica de los integrones (Sabate y Parts, 2002).

### 5.1. Integron clase 1

Un integron consta de tres regiones, dos regiones conservadas y una región variable. En el extremo 5´ conservado se encuentra el gen *intI* que codifica para la integrasa, adyacente a *intI* se encuentra el sitio de recombinación sitio-específica *attI* en el que se integra el casete (Figura 7), y por último un promotor ( $P_{ant}$ ) necesario para la expresión de los casetes de genes integrados. En el extremo 3´ conservado se localizan los genes *qacEΔ1*, *Sul1*, responsables de la resistencia a compuestos amino cuaternarios y sulfonamidas respectivamente, además de un marco de lectura abierto (*orf5*). Entre las dos partes conservadas se localiza la región variable en tamaño y composición, en el cual se insertan los casetes genéticos (Chang *et al.*, 2000; Gillings *et al.*, 2014).

El lugar de recombinación sitio especificado *attI* está formado por 65 pares de bases, en la cual los genes capturados son integrados gracias a la acción de la integrasa (*Int*); dicha integrasa es de aproximadamente 1Kb y pertenece a la familia de las recombinasas los casetes de genes pueden aparecer como moléculas de ADN circular no replicativas, pero habitualmente se encuentran en los integrones como secuencias lineales generalmente contienen un único gen en posición 3' presentan una secuencia de recombinación específica de sitio conocida como *attC*, o también denominada elemento de 59 bases (59-be) a través de la que se efectúan su reconocimiento y movilización. Los casetes son movilizados por la integrasa que reconoce el lugar *attC* del casete de genes y el lugar receptor *attI* del integron, permitiendo así tanto la integración como la escisión de dichos casetes figura 7 (Di Conza y Gutkind, 2010).

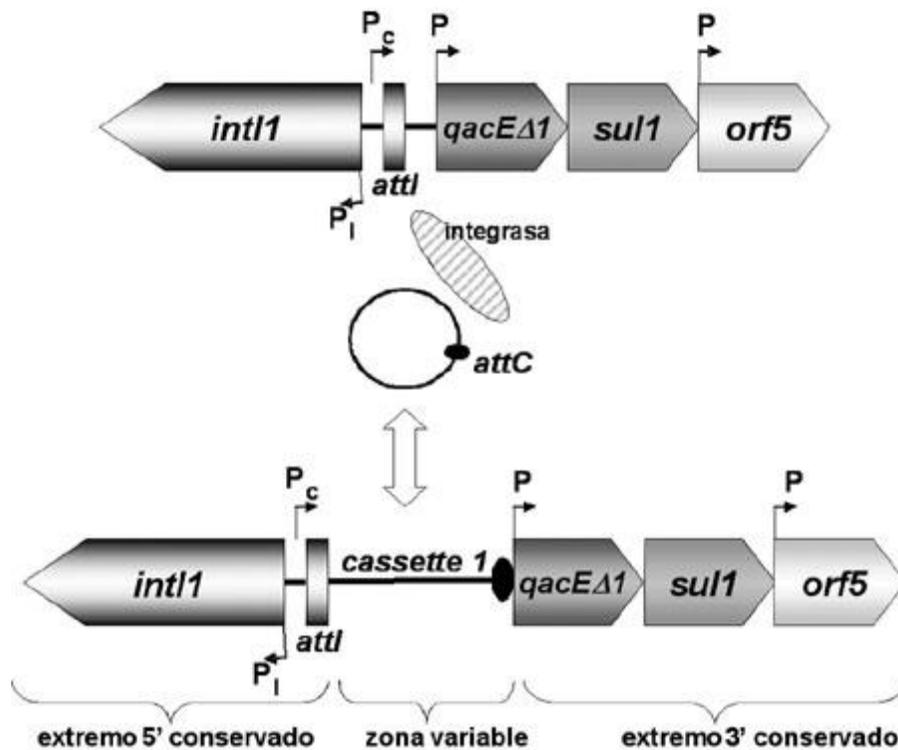


Figura 7.- Estructura del integron clase 1 (Sabate y Parts, 2002).

En la región variable del integron clase 1 se han reportado los genes *aadA1*, *aadA2* y *aadA5* los cuales confieren resistencia a estreptomicina, los genes *dfrA1* y *dfrA17* los cuales confieren resistencia a trimetoprima. El gen *bla<sub>pse-1</sub>* el cual confiere resistencia a

ampicilina, el gen *catB3* que confiere resistencia a cloranfenicol. El gen *sat1* confiere resistencia a estreptotricina (Klan *et al.*, 2009). El gen *bla<sub>oxa-53</sub>* confiere resistencia a oxacilina, el gen *aac* confiere resistencia a aminoglucidos, el gen *tet(B)* el cual confiere resistencia a tetraciclina (Brenner *et al.*, 2005).

## 6. Mecanismos de transferencia de genes de resistencia.

La bacteria, que es una célula procariota, tiene una sola molécula de ADN enrollada, compacta, está unida a la membrana citoplásmica, carece de membrana nuclear. En este único cromosoma bacteriano se encuentran todos los genes que pueden ser de dos tipos: genes estructurales y genes reguladores. Los primeros tienen secuencias de bases que codifican cadenas polipeptídicas o moléculas de ADN y los segundos únicamente tienen una función reguladora sobre los primeros. De tal manera que los genes reguladores actúan activando o deteniendo el trabajo de los genes estructurales de acuerdo con las necesidades de las bacterias (Fruchs *et al.*, 1994).

La aparición de resistencia en un microorganismo suele ser consecuencia de una mutación, que es un cambio o alteración en la secuencia de los nucleótidos del ADN de la bacteria no relacionados con la transferencia de material genético. Cuando una bacteria se hace resistente a un antibacteriano, sus descendientes suelen heredar esta característica y con el tiempo esta resistencia se difunde ampliamente entre todas las bacterias de la misma especie (Reyes y Navarro, 1998).

Los antibacterianos son sustancias no mutagénicas. En ocasiones, los microorganismos utilizan mecanismos de transferencia de material genético, conocido como resistencia transmisible, pueden ser capaces de transmitir la resistencia a la misma especie o a una distinta. Esto se realiza debido a la presencia de plásmidos y transposones (Nikaido, 1998).

Actualmente se admite que los mecanismos de transferencia de material genético tienen un papel importante en la diseminación de resistencia bacteriana a diversos antibacterianos, antisépticos y desinfectantes. La transferencia de material genético se hace a través de un plásmido al cromosoma y puede ocurrir por un evento simple de recombinación, proceso facilitado por los transposones o puede hacerse de un plásmido a otro, es lo que se denomina “recombinación” (Moellering, 1998).

Los mecanismos por los que las bacterias pueden adquirir material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción) son:

- ❖ Transformación
- ❖ Transducción
- ❖ Conjugación

Estos mecanismos de transmisión de los genes de resistencia ocurren fundamentalmente dentro de las mismas especies bacterianas, pero son posibles incluso entre géneros bacterianos distintos (Reyes y Navarro, 1998).

**TRANSFORMACIÓN:** consiste en la incorporación de ADN libre presente en el medio procedente de la lisis de otras bacterias. Este material móvil, muy pequeño de ADN capaz de “saltar” de una bacteria a otra se denomina transposon y puede insertarse por sí mismo en el cromosoma bacteriano, o en el ADN plasmídico. Una vez dentro de la bacteria receptora el ADN se integra en el cromosoma receptor, replicándose y expresándose con éste Figura 8 (Nikaido, 1998).

**TRANSDUCCIÓN:** transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra utilizando como vehículo un bacteriófago. Estos se replican dentro de las células bacterianas hasta lisar la célula o pueden integrarse en el genoma sin producir la muerte Figura 8 (Nikaido, 1998).

**CONJUGACIÓN:** consiste en el intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptora) mediante contacto físico entre ambas. En bacterias Gram negativas, la unión del donante y receptor se efectúa mediante los pili conjugativos que posee el donante Figura 8 (Miko *et al.*, 2005).

Los pilis conjugativos son estructuras en forma de tubo hueco que unen al donante con el receptor y a través de las cuales pasa el material genético (plásmidos) entre las bacterias. La formación de estos *pili* está codificada por plásmidos (Nikaido, 1998).

## 7. Resistencia en *Salmonella* spp.

### 7.1. Resistencia a antimicrobianos

Desde 1980 se reportaron cepas de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium resistentes a diversos antimicrobianos como la ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclinas, gentamicina, trimetoprim y oxaxilina (Fladynova *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2009) además de resistencia a quinolonas como el ácido nalidíxico (Robicsek *et al.*, 2006; Graziani *et al.*, 2008)

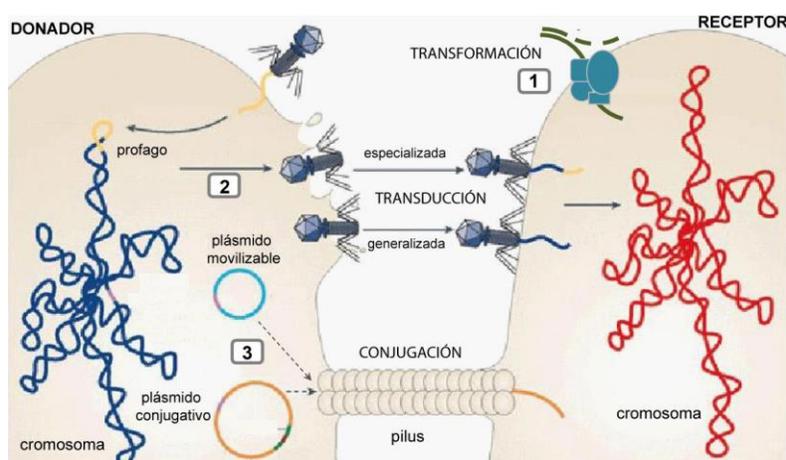


Figura 8.- mecanismos de transferencia de genes de resistencia, 1) Transformación, 2) transducción y 3) conjugación (Nikaido, 1998).

La resistencia antimicrobiana se ha relacionado con genes de resistencia como *aac* (aminoglucidos), *tet(B)* (tetraciclina), *catB3* (cloranfenicol), *drfA1* y *dfrA17* (trimetoprim), *aadA* (estreptomicina), entre otros, dichos genes se comenzaron a reportar en el genoma bacteriano, sin embargo, se ha descubierto que estos genes se pueden encontrar en plásmidos de resistencia, los cuales facilitan la transmisión de dichos genes entre los diversos géneros bacterianos, recientemente se encontraron piezas genéticas llamadas integrones las cuales tienen la capacidad de integrar estos genes

de resistencia antimicrobiana dándoles un promotor facilitando de esta manera su expresión (Cabrera *et al.*, 2006).

En el género *Salmonella* el integron clase 1 es el que se encuentra con mayor frecuencia en este género bacteriano, en Japón el integron clase 1 se ha encontrado en una frecuencia de 11.4%, en Irán un 54%, en Hong Kong 13%, en Estados Unidos en 62%, Países Bajos en 43% y en Irán en 88.3% (Ahmed *et al.*, 2005; Naghoni *et al.*, 2010; Jin y Ling, 2009; Krauland *et al.*, 2010; Essen *et al.*, 2007; Firoozeh *et al.*, 2011), por otra parte en México se encontró una frecuencia del integron clase 1 de 60% en cepas de *Salmonella* Enteritidis aisladas en el Laboratorio de Biología Molecular de Enterobacterias del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal. (CENID- Microbiología) (Cordova, 2008), en el Estado de Michoacán, México Inocencio (2011), encontró un 65% de frecuencia de integron clase 1 en cepas de *Salmonella*.

Los estudios anteriormente mencionados relacionan la presencia de los integrones clase 1 con multiresistencia antimicrobiana debido a las características de dichas piezas genéticas, esto ha ocasionado que la preocupación en salud pública y animal vaya en aumento cada día.

## 7.2. Resistencia a compuestos amino cuaternarios

Los desinfectantes y antisépticos, en contraste a los antibióticos, son por lo general una mezcla de diferentes compuestos antimicrobianos que resulta en la inactivación de múltiples células diana, debido a esto, la resistencia a estos productos es por lo general poco frecuente (Karatzas *et al.*, 2008)

Sin embargo, en *Salmonella* se han identificado diversos mecanismos de resistencia a desinfectantes como la formación de biopelículas, estas estructuras pueden convertirse en focos de contaminación en la producción de alimentos inocuos, ya que les permite adherirse y colonizar superficies bióticas y abióticas como tejido vegetal y animal, plástico, cemento y acero. Esto representa un serio problema para los sectores industrial, de salud y de la producción de alimentos, ya que, es una fuente de contaminación microbiológica constante, debido a la dificultad para eliminarlas una vez

formadas. Donland y Costerton (2002) reportan que para que el desinfectante tenga efecto sobre las células, este debe reaccionar primero con los polisacáridos de la biopelícula; con el riesgo de oxidarse al entrar en contacto con estos compuestos y perder su efectividad. Por otra parte, Kumar y Anand (1998) indican que, después de un tratamiento con biocida, las células bacterianas pueden incrementar la producción de exopolímeros, como respuesta de defensa, dejando sin efectividad al producto.

Otros mecanismos de resistencia a biocidas como los compuestos de aminocuaternario son el incremento de eflujo y la reducción de la permeabilidad, los cuales también están implicados en la resistencia a antibióticos (Karatzas et al., 2008)

La presencia de integron clase 1 también se encuentra relacionado con la presencia de resistencia a compuestos aminocuaternarios, debido a que se han identificado diversos genes casete (*qacH*, *qacG* y *qacE*), los cuales codifican proteínas que producen la inactivación de los compuestos aminocuaternarios (Mangalappalli y Korber 2006; Jaglic y Cervinkova 2012), además de que el integron clase 1 en su región conservada 3' se encuentra con frecuencia el gen *qacEΔ1* que es una mutación del gen *qacE* mencionado anteriormente (Chuanchen et al., 2008).

### III. JUSTIFICACIÓN

La salmonelosis es un problema de salud pública de distribución mundial, siendo una de las principales enfermedades gastrointestinales en los humanos asociada a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). La problemática ha aumentado en los últimos años, debido a la presencia de cepas que presentan resistencia a múltiples antimicrobianos, esto por el uso indiscriminado e inadecuado de antimicrobianos en medicina veterinaria como en medicina humana.

Desde el principio de la era antibiótica, los fenómenos de resistencia a estas sustancias han sido descritos. Cabe destacar la importancia de la multiresistencia en el género *Salmonella*, debido a que los tratamientos empleados para controlar las infecciones por este agente ya no dan los resultados esperado.

Las infecciones causadas por estas bacterias multirresistentes, causan una amplia morbilidad y mortalidad. Asimismo causan un elevado costo por mayor estancia hospitalaria y otras complicaciones.

La multirresistencia antimicrobiana y a desinfectantes como los compuestos amino cuaternario en las bacterias, se ha relacionado principalmente con genes de resistencia localizados en plásmidos o transposones, sin embargo, en los últimos años se han descrito nuevas estructuras genéticas llamadas integrones, los cuales tienen la capacidad de captar genes de resistencia y facilitar su expresión fenotípica. La capacidad que tienen estos elementos genéticos ha cobrado gran importancia debido a que diversos estudios han demostrado una elevada relación con la resistencia a diversos antimicrobianos y a compuestos amino cuaternarios que se emplean en la industria alimentaria con la presencia de integrones clase 1, lo que ha incrementado la dificultad del control y tratamiento de agentes patógenos que cuentan con esta herramienta genética.

En el mundo se ha reportado una frecuencia de 46% en el caso del integron clase 1 en *Salmonella*, este integron han provocado la expresión de resistencia a diversos

antimicrobianos entre los que podemos encontrar la ampicilina, gentamicina, trimetoprima, estreptomycin, tetraciclina, sulfametoxazol, oxacilina y a compuestos aminocuaternarios empleados como desinfectantes.

Como se mencionó anteriormente la presencia de integrones facilita la expresión de genes de resistencia; sin embargo, en el Estado de México no se han realizado estudios sobre la presencia de estas estructuras genéticas.

Por otra parte, la presencia del gen *qacΔ1* en la región conservada 3' del integron clase 1 se ha relacionado con la resistencia a compuestos empleados en la desinfección de plantas de alimentos como los compuestos amino cuaternario, esto ha despertado interés, puesto que la desinfección en las plantas de alimentos ya no es tan efectiva como lo era años atrás.

Por lo mencionado anteriormente se considera de importancia realizar un estudio para la identificación y caracterización mediante la secuenciación de las tres regiones del integron clase 1, el cual se reporta frecuentemente en *Salmonella spp.*

#### IV. HIPOTESIS

Las cepas de *Salmonella* aisladas en el Estado de México presentan resistencia múltiple a antibióticos, dicha resistencia está asociada a la presencia de integron clase 1.

## V. OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar la relación entre la resistencia fenotípica y genes de resistencia presentes en el genoma bacteriano a la ampicilina, florfenicol, estreptomycin, sulfonamidas, tetraciclina y quinolonas.

Determinar la presencia de integron clase 1 en cepas de *Salmonella* obtenidas en el Estado de México.

Objetivos específicos.

Determinar el patrón de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* del Estado de México.

Detectar la presencia del integron clase 1 en las cepas de *Salmonella* del Estado de México.

Determinar y secuenciar la presencia de genes casete localizados en la región variable del integron clase 1, en cepas de *Salmonella* del Estado de México.

## VI. MATERIAL Y METODO

### a. Aislamientos

Se estudiaron 77 aislamientos de *Salmonella* aislados de canales de bovinos (12), aves (7) y cerdos (58) en el Estado de México. Contando con los serovares que se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2.- Serovares del género *Salmonella* que se emplearan en el presente estudio.

Serovares de <i>Salmonella</i>	Número de aislamientos
S. Typhimurium ATCC 14028	1
S. Typhimurium	33
S. B Monofásica	2
S. Typhi	4
S Agona	4
S. Anatum	4
S. Breddeney	5
S. Enteritidis	1
S. Tenness	1
S. Senftenberg	4
S. London	13
S. Infantis	3
S. Reeding	1
S. C Monofásica	1
No tipificables	1

Estos aislamientos fueron aislados de rastros del centro norte del Estado de México y conservados en el cerapio del Centro de investigación y estudios avanzados en salud animal (CIESA-FMVZ-UAEMEX), se descongelaron y se cultivaron en caldo infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron a 37°C durante 24 hrs.

#### b. Resistencia microbiana

La evaluación de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos se realizó mediante el método Kirby-Bauer, según lo establece en la normativa del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Los patrones de resistencia de las cepas serán determinadas para 7 antibióticos, clasificándose en susceptibles, intermedias y resistentes, según lo establecido por CLSI los antibióticos que se evaluaron: Ampicilina (10 mcg), Estreptomina (10 mcg), Gentamicina (10 mcg), Tetraciclina (30 mcg) y Trimetopim (5mcg), sulfametoxazol (25 mcg), cloranfenicol (30mcg) (BIO-RAD). De las cepas cultivadas en caldo BHI se inocularon 10µl en caldo Mueller Hilton y se incubaron por  $24 \pm 2$  h a  $37^{\circ}$  C, posteriormente se realizó una dilución de este inóculo hasta llegar a la escala de Macfarlan de 0.5 y se sembró en Agar Mueller Hilton con un hisopo estéril y sobre el inóculo se colocaron los sensidiscos del laboratorio BIO-RAD. Se incubaron por  $24 \pm 2$  h a  $37^{\circ}$  C. La lectura de esta técnica se realizó mediante la medición de los halos de inhibición en mm. Se compararon con las tablas de interpretación de acuerdo al *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2009).

#### c. Extracción de ADN

Se tomó del caldo BHI con el crecimiento bacteriano y se sembró en agar base sangre y se incubó a  $37^{\circ}$ C durante 24hrs, posteriormente se tomaron de 2 a 3 colonias y se disolvieron en 50µl de kit de extracción (*InstaGene<sup>TM</sup>Matrix*) y se colocó en baño maría a  $56^{\circ}$ C durante 30min, posteriormente se puso a  $100^{\circ}$ C durante 8 min, después se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. El ADN se colocó a  $-20^{\circ}$ C hasta su utilización.

#### d. Amplificación de los genes del integron clase 1

Para determinar la presencia de los genes del integron clase 1 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Para el gen de la integrasa clase 1: 5´CGA TGC GTG GAG ACC GAA ACC TT3´ Y 5´GTA ACG CGC TTG CTG CTT GGA TGC 3´ el cual produce un amplicon de 286pb.

La prueba de PCR se realizó utilizando PCR-Mix, Invitrogen (0.05 U/ $\mu$ L de Taq ADN polimerasa, 0.4 mM de cada dNTP y 4mM de  $MgCl_2$ ), 1mM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 25 $\mu$ L. La amplificación se realizó en un termociclador utilizando los siguientes programas: desnaturalización del ADN a 94°C por 5 min. 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 1min, alineamiento a 59°C por 1min, extensión 72°C por 1min y una extensión final a 72°C por 10 min.

La reacción de PCR se visualizó en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio analizado en un digitalizador de imágenes (*UVP-II, USA*) (Krauland *et al.*, 2009 y Mazel *et al.*, 2000).

e. Amplificación de la región variable del integron clase 1

Para determinar la presencia de los genes en la región variable del integron clase 1 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Región variable integron clase 1: 5'GGC ATC CAA GCA GCA AGC 3' Y 5'AAG CAG ACT TGA CCT GAT 3' (Antunes *et al.*, 2006; Levesque *et al.*, 1995 y Krauland *et al.*, 2009) el cual produce amplicones de 1000, 2000 y 3000pb estos amplicones se secuenciaron para determinar, qué genes casete se encuentra presente.

La prueba de PCR se realizó utilizando PCR-Mix, Invitrogen (0.05 U/ $\mu$ L de Taq ADN polimerasa, 0.4 mM de cada dNTP y 4mM de  $MgCl_2$ ), 1mM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 25 $\mu$ L La amplificación se realizó en un termociclador utilizando el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 94°C por 5 min. 35 ciclos de desnaturalización 94°C por 1 min., alineamiento a 58°C por 1min., extensión 72°C por 5min. y una extensión final a 72°C por 7 min.

La reacción de PCR se visualizó en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, analizado en un digitalizador de imágenes (*UVP-II, USA*) (Krauland *et al.*, 2001 y White *et al.*, 2000).

f. Amplificación de la región 3' del integron clase 1.

Para determinar la región 3'CS del integron clase 1 (presencia del gen *qacEΔ1* de resistencia a compuestos amino cuaternarios, y el gen *Sul1* resistencia a sulfonamidas) se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: *qacEΔF* 5'TAA GCC CTA CAC AAA TTG GGA GAT AT 3', *qacEΔ1* 5'GCC TCC GCA GCG ACT TCC ACG 3' y *sulR* 5'-GGG TGC GGA CGTAGT CAG C-3' estos oligonucleótidos mostraron productos de 363 y 1,12pb (Chuanchuen *et al.*, 2007), la reacción de PCR se realizó utilizando una mezcla comercial (PCR-Mix, Invitrogen), ). La prueba de PCR se realizó utilizando PCR-Mix, Invitrogen (0.05 U/μL de Taq ADN polimerasa, 0.4 mM de cada dNTP y 4mM de MgCl<sub>2</sub>), 1mM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 25μL. La amplificación se realizó en un termociclador utilizando el siguiente programa: desnaturalización del ADN a 95°C por 5 min. 30 ciclos de desnaturalización 95°C por 45 seg., alineamiento a 67°C por 45 seg., extensión 72°C por 45 seg. y una extensión final a 72°C por 10 min.

Para determinar la presencia de los genes *qacH* y *sul3* se utilizaron los oligonucleótidos: *qacHF* 5' CTCGCACTCAAGTCCATCC 3', *qacHR* 5'CTAACGATAAGTCCCATGCC 3' y *sul3R* 5'CCGATGGAGGACTTTATTTA 3' estos oligonucleótidos amplifican productos de 1000 y 2000 pb respectivamente. La prueba de PCR se realizó utilizando la misma mezcla de las reacciones anteriores. La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial del ADN a 94°C por 5 min. 30 ciclos con una desnaturalización 94°C por 45 seg., alineación a 61°C por 3 min., extensión 72°C por 5min. y una extensión final a 72°C por 10 min. Las reacciones de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio analizado en un digitalizador de imágenes (UVP-II, USA).

La reacción de PCR se visualizó en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, analizado en un digitalizador de imágenes (UVP-II, USA) (Mazel *et al.*, 2000 y Chuachuen *et al.*, 2008).

#### g. Purificación de ADN

Se realizó la purificación del ADN a partir de los geles de agarosa y se empleó un kit comercial (Wizard SV. Promega) para este proceso. En donde se cortó la banda del gel

de agarosa y se depositó en un vial, en donde se agregaron tres volúmenes de Membrane Binding Solution y se incubó a 55°C hasta fundir el gel, posteriormente se transfirió a la membrana y se centrifugó a 16000g por 1min. Posteriormente se agregó 700µL de Membrane Wash Solution y se centrifugó nuevamente a 16000g por 1 min., posteriormente se agregó 500µL de Membrane Wash Solution y se centrifugó a 16000g por 5min., se colocó la membrana en un vial nuevo y se agregaron 50µL de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 16000g por 1min. Y se congelaron a -20°C para enviar a secuenciar.

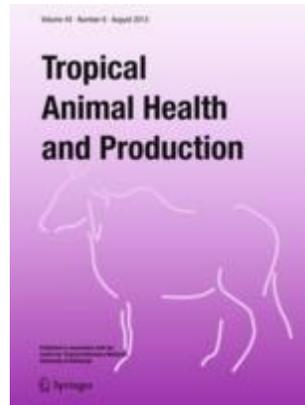
#### h. Secuenciación.

Para realizar la secuenciación de los productos de PCR se envió el ADN purificado a partir del gel de agarosa con una cantidad de 25µ teniendo como mínimo de ADN de 50ng/µl. A la empresa MacroGen (Seul, Corea) para su secuenciación. Las secuencias fueron analizadas con el programa Mega Versión 5.2 y comparadas con el programa BLAST con la base de datos del *Genbank* (Chuanchuen *et al.*, 2007).

## VII. RESULTADOS

### 1 Artículo publicado

#### **Tropical Animal Health and Production**



Es una revista internacional de publicación de los resultados de investigaciones originales en cualquier campo de la salud animal, el bienestar y la producción con el objetivo de mejorar la salud y la productividad del ganado, y una mejor utilización de los recursos animales, incluidos los animales salvajes en las zonas tropicales, subtropicales y entornos agroecológicas similares.

Publicado en asociación con el Centro de Medicina Veterinaria Tropical, Universidad de Edimburgo

Factor de impacto: 0.843

## Phenotypic–genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico

Jorge Antonio Varela-Guerrero · Martín Talavera-Rojas ·  
Adriana del Carmen Gutiérrez-Castillo ·  
Nydia Edith Reyes-Rodríguez · Jesús Vázquez-Guadarrama

Accepted: 21 November 2012 / Published online: 7 December 2012  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

**Abstract** *Salmonella* is a public and animal health problem due to the generation of strains multiresistant to antimicrobial products. The objective of this study was to determine prevalence and antimicrobial phenotypic and genotypic resistance of *Salmonella* spp. isolated from beef cattle carcasses killed in slaughterhouses of the north central zone of the State of Mexico. Sampling was carried out according to the European Directive 2001/471/EC; isolation and identification of the strain was carried out according to the Mexican Official Standard NOM-114-SSA1-1994; resistance was established by CMI according to the National Committees for Clinical Laboratory Standards (NCLS) and multiplex PCR according to Ahmed et al. (Journal of Applied Microbiology 106:402–409, 2009) with *PSE-1*, *tetG*, *qnrS*, *FloR*, *STR*, and *sull* oligonucleotides. Twenty-seven strains of *Salmonella* spp. were obtained from 327 samples (prevalence of 0.083); 19 strains (70 %) were resistant to 10 µg/ml of ampicillin, 15 of these (79 %) had the *PSE-1* gene; 22 strains (84 %) were resistant to 30 µg/ml streptomycin, 14 of these (63.6 %) had the *STR* gene. Genes *PSE-1* and *STR* were factors in the presence of resistance, the rest of the genes (*tetG*, *qnrS*, *FloR*, and *sull*) were not factors of resistance in the studied strains.

**Keywords** Beef cattle carcass · *Salmonella* · Multidrug resistance · PCR · Genes

### Introduction

In Mexico, you can find different cattle production systems to supply such as: intensive, semi-intensive, and extensive, depending on the weather and region of the country. In a temperate climate that prevails in the State of Mexico, intensive production system is employed, and the age at which animals reach the slaughter line is in adulthood as fattening periods are prolonged by the lack of quality forage (SAGARPA-SENASICA 2009).

Meat is susceptible of contamination and frequently it is implicated in food-borne transmissible diseases (Gill 2007). One of the agents related with meat and animal-origin food contamination is *Salmonella* spp., considered to be one of the most virulent pathogens for humans and animals and, therefore, one of the greatest problems in public health (Park et al. 2009; Bugarel et al. 2011).

A significant aspect of this pathogen for public health is its resistance to diverse antimicrobial products; mainly due to the indiscriminate use of these substances in humans and animals. In the breeding of cattle for slaughter, no control is implemented over the drugs and hormones that can be harmful to the consumer, causing the discovery of multiresistant strains for the use of drugs (SAGARPA-SENASICA 2009)

The most frequently found resistances are to ampicillin, streptomycin, chloramphenicol, tetracycline, fluoroquinolones, and sulfonamides (Talavera et al. 2007; Walsh et al. 2008; Ahmed et al. 2009). The genes related to antibiotic resistance mentioned above are: *Pse* that confers resistance to ampicillin; *FloR* that is related to florfenicol resistance; *STR* that is related to streptomycin resistance; *Sull* that is related to

J. A. Varela-Guerrero · M. Talavera-Rojas (✉) ·  
A. d. C. Gutiérrez-Castillo · N. E. Reyes-Rodríguez  
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal,  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
Universidad Autónoma del Estado de México,  
Autopista Toluca-Atlacomulco km 15.5,  
Toluca, Mexico C.P. 50200  
e-mail: talaverarojas@gmail.com

J. Vázquez-Guadarrama  
Microbiología Animal, Instituto Nacional  
de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias,  
Carretera México-Toluca km 15.5,  
Palo Alto, Distrito Federal C.P. 05110, Mexico

resistance to sulfonamides; *TetG* that is related to tetracycline resistance; and *qnrS1* that gives resistance to fluoroquinolones (Hopkins et al. 2007; Henriques et al. 2008; Park et al. 2009; Ahmed et al. 2009; Kozak et al. 2009).

This paper aims to identify the phenotypic and genotypic resistance to antibiotics mentioned above in strains of *Salmonella* spp. isolated from beef cattle in north-central state of Mexico to establish the prevalence of such resistance in the beef cattle mentioned.

### Materials and methods

This study was carried out in three municipal slaughterhouses in the north-central zone of the State of Mexico, the average kill volume of beef cattle in the three slaughterhouses is 575 heads per week in adult age, the sample size was 109, which was weighted in the three slaughterhouses proportionally to the killed animals' number (Reyes 2007), slaughterhouse 1, 23 of 120 killed animals (20.87 %); slaughterhouse 2, 15/80 (13.91 %); and slaughterhouse 3, 71/375 (65.2 %). Three repetitions were carried out in each slaughterhouse during the period of winter 2010. Animals that were sampled were identified at the time of entering the slaughter line, and precautionary measures were observed during the process.

Samples, each 100 cm<sup>2</sup> in size, were taken from four zones of the carcass (hip: semimembranosus muscle, flank: rectus abdominis muscle, chest: pectoral muscles, and neck: cervical portion of the trapezius muscle). Each zone was rubbed vigorously ten times in a vertical manner and ten horizontally using sterile gauze previously imbibed with peptone water (Bravo 2006). The gauze was deposited in a previously marked 25-mL tube with peptone water (Hernandez et al. 2007). Mesenteric lymph nodes and gall bladder were deposited in sterile bags (Talavera et al. 2007); all samples were transported at refrigeration temperature for bacteriological isolation and identification.

Samples were pre-incubated 24±2 h at 37 °C. In order to identify *Salmonella* spp. Xylose lysine deoxycholate agar and brilliant green agar were seeded and incubated 24±2 h at 37 °C. Suspect colonies were seeded in lysine iron agar and triple sugar iron agar and incubated 24 h at 35 °C (NOM-114-SSA1-1994). Suspect strains were confirmed serologically with *Salmonella* O Antiserum Poly A-I and Vi, Factors 1–16, 19–25, 34 and Vi (NOM-114-SSA1-1994). Afterwards, serotype varieties were identified by using Kauffman–White scheme using antisera of group E factor 4, factor Vi and flagellar antigens (H) and factors d, i, g and m separately; all antisera were from the DIFCO brand (Park et al. 2009).

The doses used for therapy against *Salmonella* were used as a base for the minimum inhibitory concentration (Rosenstein 2009).

Detection of bacterial resistance to antimicrobial agents was carried out by the minimum inhibiting concentration as established by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (NCLS 2009). Antibiotics that were used were: ampicillin (10, 20, 40, 80 µg/ml), florfenicol (30, 60, 120, 240 µg/ml), streptomycin (30, 60, 120, 240 µg/ml), tetracycline (30, 60, 120, 240 µg/ml), sulfamethoxazole (25, 50, 100, 200, 1,200 µg/ml), and nalidixic acid (30, 60, 120, 240, 480 µg/ml). *Salmonella* isolates were seeded in Mueller Hilton broth with the antimicrobial concentrations mentioned above and then incubated for 24±2 h at 37 °C; after this, reading was carried out using a spectrophotometer at a 525-nm wavelength NCLS (2009).

DNA extraction was carried out according to the methodology proposed by Ahmed et al. (2009). For the polymerase chain reaction (PCR), six oligonucleotides were used; base pair sequences and expected size of amplification are shown in Table 1 (Chiu et al. 2006; Robicsek et al. 2006). Multiplex PCR consisted of 5 µl 10× PCR buffer, 5 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl of 200 mM DNTPs, 1 µl of each primer (*Pse*, *FloR*, *STR*, *SulI*, *TetG*, *qnrS1*), 0.5 µl (1 unit/µl) of

**Table 1** Oligonucleotide sequences used in the PCR technique

Gene	Primer	Oligonucleotide Sequences (5'–3')	Fragment size (bp)	GenBank accession number
<i>pse</i>	<i>Pse-1</i>	GGCAATCACAACGATGATGCGT GGCTCAATACGGTCTAGACGAGT	156	AY339985.1
<i>FloR</i>	<i>floR</i>	CTTTGGCTATACTGGCGATG GATCATTACAAGCGCGACAG	266	AY339985.1
<i>STR</i>	<i>Str</i>	AGACGCTCCGCGCTATAGAAGT CGGACCTACCAAGGCAACGCT	203	AY339985.1
<i>SulI</i>	<i>SulI</i>	CGGATCAGACGTCGTGGATGT TCGAAGAACCACCAATCTCGT	351	AY339985.1
<i>TetG</i>	<i>tetG</i>	AGCAGCCTCAACCAATGCGGAT GGTGTCCACTGAAAACGGTCTT	391	AY339985.1
<i>QnrS</i>	<i>qnrS</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA TAAATTGGCACCTGTAGGC	417 <sup>†</sup>	–

Taq DNA polymerase (Invitrogen/USA), 5 µl of bacterial DNA, and 17.5 µl of injectable water (Chiu et al. 2006). Thirty-five cycles were used with a denaturing at 95 °C for 45 s, primer alignment at 56 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min. At the end of the reaction cycles, they were incubated for 5 min at 72 °C and then temperature was lowered to 4 °C to preserve the sample (Chiu et al. 2006); reaction products were subjected to 2 % agarose gel electrophoresis for 45 min at 100 V with 1.5 µl of load buffer (1× TAE). PCR products were visualized with ethidium bromide and examined with an UV transilluminator (Ahmed et al. 2009).

The relationship between phenotypic and genotypic resistance to the studied antibiotics, was established by Fisher’s exact test with a  $p < 0.05$  significance, the relation between contaminated carcasses and carrier animals was analyzed by epidemiological association estimating odds ratio (OR) using the Epi Info version 3.6 program (Talavera et al. 2011).

**Results**

Of the 327 samples obtained in the three studied municipal slaughterhouses, 27 isolations of *Salmonella* spp. were obtained (8.3 %). The relationship between the carrier animals and the contaminated carcasses was as follows: from 19 carrier animals, 4 (21 %) were positive to isolation from the carcass and from 308 non-carrier animals, 9 (10 %) were positive to isolation from the carcass; demonstrating an OR=9 with a  $p < 0.05$  significance (Table 2). Serovars that were found were *Salmonella* Typhimurium 13/27 (48 %), *Salmonella* Typhi 11/27 (41 %), *Salmonella* Enteritidis 1/27 (4 %), while 2/27 (7 %) non-serotyped.

Considering the relationship of phenotypic and genotypic resistance we have 19 (70.37 %) isolates that were resistant to 10 µg/ml of ampicillin, 14 (73.68 %) of these, 19 had the presence of the *Pse-1* gene. Of the eight strains that expressed sensitivity to ampicillin, one (12.5 %) had the *Pse-1* gene ( $p < 0.05$ ), which indicates that the presence of the *Pse-1* gene is an important factor for the presentation of resistance to ampicillin; nevertheless, there may be other genes that may be implicated in the presentation of resistance to this antibiotic. Twenty isolates (74.1 %) showed resistance to 30 µg/ml of streptomycin, 14 (70 %) of these 20 isolates had the *STR* gene ( $p < 0.05$ ) that gives resistance

to streptomycin, indicating that the *STR* gene is relevant to the presentation of resistance to streptomycin in the isolates that were recovered since none of the sensitive isolates had the *STR* gene. Three strains (11.11 %) showed resistance to 30 µg/ml of florfenicol, albeit none expressed the *FloR* gene; nevertheless, of 24 isolates (88.88 %) sensitive to florfenicol, 2 (8.33 %) expressed the diagnostic band of the *FloR* gene ( $p > 0.05$ ), which indicates that in the studied isolates, the *FloR* gene was not an important factor for the presentation of resistance to florfenicol. Nine isolates (33.33 %) showed resistance to 30 µg/ml of tetracycline, three of these nine (33.33 %) showed the *tetG* gene ( $p > 0.05$ ); of 18 isolates (66.66 %) sensitive to tetracycline, 8 (44.44 %) had the *tetG* gene which indicates that this gene is not an important factor for the presentation of resistance to tetracycline. From 12 isolates (44.44 %) resistant to nalidixic acid, 1 (8.3 %) had the *qnrS* gene that confers resistance to fluoroquinolones, which indicates that the *qnrS* gene is not an important factor for the presentation of resistance to nalidixic acid ( $p > 0.05$ ). Of 27 isolates that showed resistance to sulfamethoxazole, none expressed the *SulI* gene that confers resistance to sulfonamides ( $p > 0.05$ ) therefore phenotypic resistance expressed by those isolates is not related to the presence of that gene (Fig. 1, Table 3).

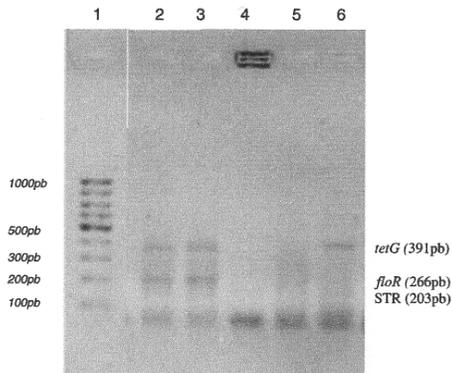
**Discussion**

Prevalence found in this study was 0.083, which is lower than the one obtained in a slaughterhouse in the State of Hidalgo, Mexico, where the prevalence of *Salmonella* was found to be 0.11 (Hernandez et al. 2007); nevertheless, it was higher than the value which was obtained in the slaughterhouses of the State of Yucatan, Mexico, where the prevalence of *Salmonella* reached 0.068 (Zaid et al. 2006). These results may vary due to several factors such as the sampling techniques, or the season of the year when it was carried out. Also, the NOM-194-SSA1-2004 that regulates, among other things, the sanitary specifications of establishments that slaughter and renders animals for market establishes the absence of *Salmonella* in refrigerated products and beef cattle slaughtered. The presence of *Salmonella* supposes a public health risk for consumers

In the case of antibiotic resistance, it was found that for ampicillin, 14 strains (73.68 %) had the *Pse-1* gene. This gene provides phenotypic resistance to β-lactamic drugs

**Table 2** Odds ratio between carrier animals and contaminated carcasses

	Carcasses positive to <i>Salmonella</i> spp. isolation	Carcasses negative to <i>Salmonella</i> spp. isolation.	Total
OR=9	4	15	19
IC=2.5<OR<32.2	9	299	308



**Fig. 1** Diagnostic band of genes *tetG*, *FloR*, *STR* and *Pse-I* in 2 % agarose gel. 1 molecular weight marker 100–1,000 pb (CLP), 2 *S. Typhimurium*, 3 *S. Typhimurium*, 4 *S. Typhimurium*, 5 *S. Typhi*, 6 *S. Typhimurium*

such as ampicillin (Chiu et al. 2006; Palmgren et al. 2006). The presence of the *Pse-I* gene is similar to studies carried out in the Czech Republic (Palmgren et al. 2006), although both results were higher than those found in studies carried out in France and the United Kingdom, where 51 and 25 % were found, respectively (Chiu et al. 2006; Randall et al. 2006) although these values were lower than what the other studies reported (Weill et al. 2006; Herrero et al. 2006; Beutlich et al. 2010) in France, Germany, and Spain where the percentages found were 94, 82, and 91 %, respectively. Considering the strain that had the *Pse-I* gene but that showed phenotypic sensitivity to ampicillin, it can be mentioned that possibly this microorganism had not been exposed to selective pressure where the expression of the gene would have been obligated. In relation to the five strains that

did not have the *Pse-I* gene, but did show phenotypic resistance, it is possible that resistance may be related to other genes such as *TEM* and *OXA-30* that also confer resistance to  $\beta$ -lactamic drugs (Weill et al. 2006; Herrero et al. 2006; Beutlich et al. 2010).

Fourteen strains (51.85 %) were found that had the *STR* gene that provides resistance to streptomycin (Chiu et al. 2006; Palmgren et al. 2006; Beutlich et al. 2011). These results are higher than those found in studies carried out in the Czech Republic, France, and the UK with 17, 50, and 51 %, respectively (Chiu et al. 2006; Palmgren et al. 2006; Beutlich et al. 2011). Of the six strains that had resistance, but not the *STR* gene, it can be said that resistance might be linked to a modification of ribosomal proteins that inactivate streptomycin (Mandomando et al. 2009).

Regarding florfenicol resistance, two strains (7.4 %) were identified that had the *FloR* gene; although these two strains were sensitive to the antimicrobial product. The result that was obtained was lower than what has been reported for *Salmonella* strains isolated in European countries where the average percentage was 79 % (Chiu et al. 2006; Palmgren et al. 2006; Beutlich et al. 2010; Beutlich et al. 2011). In the case of the three strains that showed resistance, but not the *FloR* gene, resistance could be linked to other genes such as *catA1* and *cmlA1* (Beutlich et al. 2010), or to genes such as *Ffc*, *pp-flo*, *cfr*, and *fexA* (Targant et al. 2010; Lang et al. 2010), or also to the resistance plasmid R55 (Lang et al. 2010).

Eleven strains resistance to tetracycline (41 %) had the *tetG* gene. This result is higher than the one found in strains of *Salmonella* isolated in Germany where this gene was not present; nevertheless, these values are lower than what has been reported in other European countries, 51 to 79 % (Chiu et al. 2006; Palmgren et al. 2006; Beutlich et al. 2011). In the case of the six strains that did not have the *tetG* gene but did have resistance to tetracycline, it could be mentioned that resistance could be related to other genes such as *tetA*,

**Table 3** Relationship of phenotypic and genotypic resistance in *Salmonella* spp. strains

Resistance gene	Present/absent	Resistant to	No. resistant (%)	No. susceptible (%)	Total (%)
<i>Pse-I</i>	Present	Ampicillin	14(51.78 %)	1(3.7 %)	15(55.56 %)
	Absent	Ampicillin	5(18.51 %)	7(26 %)	12(44.44 %)
<i>str</i>	Present	Streptomycin	14(51.78 %)	0(0 %)	14(51.78 %)
	Absent	Streptomycin	6(22.22 %)	7(26 %)	13(48.22 %)
<i>FloR</i>	Present	Florfenicol	0(0 %)	2(7.4 %)	2(7.4 %)
	Absent	Florfenicol	3(11.11 %)	22(81.48 %)	25(92.59 %)
<i>tetG</i>	Present	Tetracycline	3(11.11 %)	8(29.63 %)	11(40.74 %)
	Absent	Tetracycline	6(22.22 %)	10(37 %)	16(59.22 %)
<i>qnrS</i>	Present	Nalidixic acid	1(3.7 %)	0(0 %)	1(3.7 %)
	Absent	Nalidixic acid	11(40.74 %)	15(55.55 %)	26 (96.3 %)
<i>SulI</i>	Present	Sulfamethoxazole	0(0 %)	0(0 %)	0(0 %)
	Absent	Sulfamethoxazole	27(100 %)	0(0 %)	27(100 %)

*tetB*, *tetC*, *tetD*, and *tetE* (Ma et al. 2007; Henriques et al. 2008; Beutlich et al. 2010; 2011; Hyung et al. 2010).

One strain resistant to nalidixic acid (3.7 %) had the *qnrS* gene that provides Enterobacteriaceae with resistance to quinolones or fluoroquinolones (Robicsek et al. 2006; Hopkins et al. 2007) nevertheless, this gene that is located in plasmid DNA had low presence in the studied strains; this result is similar to what has been reported in European countries (Robicsek et al. 2006; Hopkins et al. 2007; Beutlich et al. 2010). Of the 11 strains that had resistance, but did not have the *qnrS* gene, it is possible that resistance may be due to other genes such as *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, and *qnrD* (Robicsek et al. 2006; Hopkins et al. 2007; Beutlich et al. 2010) and may be related to a mutation of the *GyrA* gene (Talavera et al. 2007; Yang et al. 2008).

In relation to the *SulI* gene that confers resistance to sulfonamides, it was not found in the analyzed *Salmonella* spp. strains; but in studies carried out in European countries, it was found on average in 80 % of strains (Chiu et al. 2006; Palmgren et al. 2006; Beutlich et al. 2010; Beutlich et al. 2011). The 27 isolated strains (100 %) had phenotypic resistance to sulfamethoxazole, but did not have the *SulI* gene; therefore, resistance could be related to other genes such as the *Sul2*, *Sul3*, and *SipB/C* genes (Palmgren et al. 2006; Beutlich et al. 2010; 2011).

What has been mentioned above is a preoccupation for public health, even more so because the studied strains had multiple resistances to ampicillin, florfenicol, streptomycin, tetracycline, sulfonamides, and nalidixic acid. Likewise, two of the studied genes, *Pse-I* and *STR* provide phenotypic resistance to the antibiotics described above and the rest of the genes are not an important factor for resistance, even though there are other genes that could be linked to the resistance shown by the studied strains. Currently, the presence of multiple resistance in strains found worldwide have caused great problems in the therapy of this disease, since the antibiotics used today no longer work, or do not have the expected results.

Since gastroenteritis caused by *Salmonella* are every day more frequent and animals are reservoirs of the agent, we are obligated to develop epidemiological surveillance programs that insure the proper use of antimicrobial agents, as well as regulate good practices in the kill process in slaughter establishments that are dedicated to the production of animal-origin foods.

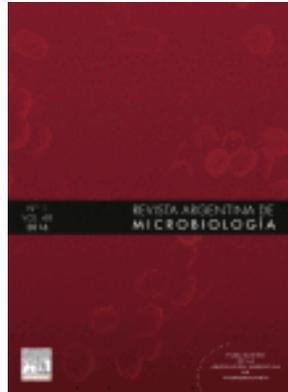
## References

- Ahmed, A.M., Ishida, Y. and Shimamoto, T. 2009. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 402–409.
- Beutlich, J., Rodriguez, I., Schroeter, A., Käsbohrer, A., Helmuth, R. and Guerre, B., 2010. A Predominant Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Saintpaul Clonal Line in German Turkey Food Products. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 3657–3667.
- Beutlich, J., Jahn, S., Malorny, B., Hauser, E., Hühn, S., Schroeter, A., Rodicio, M.R., Apple, B., Threlfall, J., Mevius, D., Helmuth, R. and Guerra, B. 2011. Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in European *Salmonella* Genomic Island 1-positive *Salmonella enterica* Isolates from Different origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:16, 5655–5664.
- Bravo, T.A. 2006. Manual de procedimientos para el muestreo microbiológico oficial en carnes faenadas en mataderos de exportación. Chile.
- Bugarel, M., Granier, S.A., Welli, F.X., Frach, P. and Brisabois, A. 2011. A multiplex real-time PCR Assay Targeting Virulence and resistance genes in *Salmonella enteric* serotype Typhimurium. *BMC Microbiology*, 11:151, 1–11.
- Chiu, C.H., Su, L.H., Chu, C.H., Wang, M.H., Yen, C.M., Welli, F.X. and Chu, C. 2006. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by Multiplex PCR. *Journal Clinical Microbiology*, 44, 2354–2358.
- Gill, C.O. 2007. Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Science*, 77, 149–160.
- Henriques, I.S., Fonseca, F., Aviles, A., Saavedra, M.J. and Correia, A. 2008. Tetracycline-resistance genes in Gram-negative isolates from estuarine waters. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 526–533.
- Hernandez, J.S., Zuñiga, E.A., Sanchez, O.I., Castro, R.J., Roman, G.A.D. and Santos, L.E.M. 2007. Microbiological conditions during the slaughter process at a municipal slaughterhouse in Hidalgo, Mexico. *Veterinaria México*, 38, 187–195.
- Herrero, A., Rodicio, M.R., Gonzalez, H.M.A. and Mendoza, M.C. 2006. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid P<sub>uo</sub>-St<sub>VR2</sub>. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 39–45.
- Hopkins, K.L., Wootton, L., Day, M.R. and Threlfall, E.J. 2007. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *Journal Antimicrobiol Chemotherapy*, 59, 1071–1075.
- Hyung, K.J., Young, H.S., Soo, S.J., Eun, H.J., Woo, J.J., Phil, S.S., Choresca, Jr.C., Jaie, C.Y., Ho, P.Y. and Chang, P.S. 2010. Molecular characterization of tetracycline and quinolone resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 12:1, 41–48.
- Kozak, G.K., Pearl, D.L., Parkman, J., Reid-Smith, R.J., Deckert, A. and Boerlin. 2009. Distribution of Sulfonamide Resistance Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from Swine and Chickens at Abattoirs in Ontario and Quebec, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:18, 5999–6001.
- Lang, K.S., Anderson, J.M., Schawrz, S., Williamson, L., Handelsman, J. and Singer, R.S. 2010. Novel Florfenicol and Chloramphenicol Resistance Gene Discovered in Alaskan Soil by Using Functional Metagenomics. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:15, 5321–5326.
- Ma, M., Wang, H., Yu, Y., Zhang, D. and Liu, S. 2007. Detection of antimicrobial resistance genes of pathogenic *Salmonella* from Swine with DNA microarray. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 161–167.
- Mandomando, I., Jaintilal, D., Pons, M.J., Valles, X., Espasa, M., Mensa, L., Sigauque, B., Sanz, S., Sacarla, J., Macete, E., Abacassamo, F., Alonso, P.L. and Ruiz, J. 2009. Antimicrobial Susceptibility and Mechanisms of Resistance in *Shigella* and *Salmonella* Isolates from Children under Five Years of Age with Diarrhea in Rural Mozambique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:6, 2450–2454.

- NCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2009). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. 10 ed. vol. 29, no. 3. Approved standard M100-S19. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, P.A.
- Norma Oficial Mexicana NOM-144-SSA1-1994. (1994). Bienes y servicios. Métodos para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004. (2004). Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expedido. Especificaciones sanitarias de productos.
- Palmgren, H., Aspan, A., Broman, T., Bengtsson, K., Blomquist, L., Bergström, S., Sellin, M., Wollin, R. and Olsen, B. 2006. *Salmonella* in Black-headed gulls (*Larus ridibundus*); prevalence, genotypes and influence on *Salmonella* epidemiology. *Epidemiology and Infection*, 134, 634–644.
- Park S.H., Kim H.J., Cho W.H., Kim J.H., Oh M.H., Kim S.H., Lee B.K., Rieke S.C. and Kim H.Y. 2009. Identification of *Salmonella enterica* subspecies I, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Enteritidis* and *Typhi* using multiplex PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 301, 137–146.
- Randall, L.P., Cooles, S.W., Coldham, N.C., Stapleton, K.S., Piddock, L.J. and Woodward, M.J. 2006. Modification of enrofloxacin treatment regimens for poultry experimentally infected with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT 104 to minimize selection of resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 50, 4030–4037.
- Reyes, R. N. E. 2007. Frecuencia de aislamiento de *Salmonella* spp. en pollos para consumo humano provenientes de los mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahn, D.F., Jacoby, A. and Hooper, D.C. 2006. *qnr* Prevalence in cefazidime resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2872–2874.
- Rosenstein SE. 2009. *Prontuario de especialidades veterinarias farmacéuticas, biológicas y nutricionales*. Thomson, ed 29, México.
- SAGARPA-SENASICA 2009 Manual de buenas practicas pecuarias en la producción de carne de ganado bovino en confinamiento. México.
- Talavera, R.M., Vázquez, Ch.J.C., Flores, B.R., Robles, G.F., Lagunas, B.S. and Alonso, F.M.U. 2007. *GyrA* gene mutations and fluoroquinolone resistance in *Salmonella* isolates from pigs in central Mexico. *Veterinary Record*, 160, 630–632.
- Talavera, R.M., Varela, G.J.A., Reyes, R.N.E., Lagunas, B.S., Valladares, C.B., Alonso, F.M.U., and Velázquez, O.V. 2011. Resistencia genotípica de genotipos de cepas de *Salmonella* spp. de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México, *Veterinaria Mexico*, 42:4, 269–276.
- Targant, H., Ponsin, C., Brunet, C., Doublet, B., Cloeckert, A., Madec, J.Y. and Meunier, D. 2010. Characterization of resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* isolated from diseased cattle in France (2002–2007). *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 419–425.
- Walsh, C., Duffy, G., Nally, P., O’Mahony, R., McDowell, D.A. and Fanning, S. 2008. Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella Typhimurium* DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 210–215.
- Weill, F.J., Gesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demartin, M., Polomack, L. and Grimont, P.A.D. 2006. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* from Humans in France (1993 to 2003). *Journal Clinical Microbiology*, 44, 700–708.
- Yang, H., Chen, H., Yang, Q., Chen, M. and Wang, H. 2008. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in clinical Isolates of Enterobacteriaceae from nine Teaching Hospitals in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 4268–4263.
- Zaid, M.B., Lopez, M.C. and Calva, E., 2006. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas, biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48, 121–125.

## 2 Artículo enviado

### Revista Argentina de Microbiología



La Revista Argentina de Microbiología es una publicación trimestral editada por la Asociación Argentina de Microbiología desde 1969, con el objetivo de difundir trabajos en las distintas áreas de la microbiología. Publica trabajos de investigación completos, informes breves y actualizaciones sobre microbiología básica y clínica, fisiología microbiana, microbiología de alimentos, microbiología industrial, de suelos, de aguas, virología, micología, parasitología, taxonomía microbiana, inmunología, biotecnología, prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas. Esta revista tiene distribución nacional e internacional y recibe trabajos de autores argentinos y del exterior.

Factor de impacto: 0.800

Estimado/a Dr. Talavera-Rojas:

Le confirmamos que se ha iniciado el proceso de revisión de su artículo “Identificación de los genes *qacE*Δ1, *qacH*, *sul1* y *sul3* en la región 3´CS del integron clase 1 en aislamientos de *Salmonella* spp.” (ref. RAM-D-16-00048), enviado a Revista Argentina de Microbiología para su posible publicación.

Para consultar el estado de su artículo debe seguir los siguientes pasos:

1. Acceda a la página <http://ees.elsevier.com/ram/>.

2. Introduzca sus datos de registro

Usuario: [talaverarojas@gmail.com](mailto:talaverarojas@gmail.com);

Si no sabe o no recuerda su Password, entre en:

[http://ees.elsevier.com/RAM/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/RAM/automail_query.asp)

3. Acceda como autor al sistema (esto le llevará a su menú principal).

4. Entre en “Submissions Being Processed”.

Muchas gracias por el interés mostrado por nuestra revista.

Reciba un cordial saludo,

Montserrat Valero

Journal Manager

Revista Argentina de Microbiología

Identificación de los genes *qacEΔ1*, *qacH*, *sul1* y *sul 3* en la región 3´CS del integron clase 1 en aislamientos de *Salmonella* spp.

Jorge A. Varela Guerrero <sup>a</sup>

Martín Talavera Rojas <sup>\*a</sup>

Edgardo Soriano Vargas <sup>a</sup>

Jesús Vázquez Navarrete <sup>b</sup>

Valente Velázquez Ordoñez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco km 15.5, Toluca, México. C.P. 50200. Dirección electrónica: [talaverarojas@gmail.com](mailto:talaverarojas@gmail.com)

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Microbiología Animal. Carretera México-Toluca km 15.5, Palo Alto, Distrito Federal. C.P. 05110.

### **Agradecimientos.**

A la Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento del Proyecto de investigación 3182/2012/CHT

## Resumen.

El integron clase 1 responsable de la resistencia antimicrobiana usualmente tiene una región 3´CS conservada, integrada por los genes *qacEΔ1* y *sul1*, estos genes confieren resistencia a compuestos amino cuaternario y sulfonamidas respectivamente; sin embargo, se han identificado variantes en esta región que son importantes desde una perspectiva de resistencia antimicrobiana y epidemiológica. Se analizaron 77 aislamientos de *Salmonella* spp. obtenidos de cerdos, aves y bovinos en rastros del Estado de México, México. En el 40% de los aislamientos se presentó el integron 1, los cuales muestran una diversidad considerable en su porción distal. Se detectó la porción 3´CS conservada con los genes clásicos; sin embargo, las deleciones de ambos componentes (*qacEΔ1* y *sul 1*) fueron frecuentes. Una región distal inusual compuesta por los genes *qacH* y *sul3* fue de interés, éstos genes confieren la misma resistencia que la región 3´CS original; sin embargo, tienen diferente origen que aún no se ha explicado. Esta diversidad en la porción distal del integron clase 1 puede provocar problemas graves en la población humana y dificultar la prevención, control y tratamiento de los patógenos que estén relacionados con estas piezas genéticas como *Salmonella*.

Palabras Clave: Resistencia antimicrobiana, Integrones, Caracterización molecular.

Identification of the *qacEΔ1*, *qacH*, *sul1* and *sul3* genes within the 3'CS region of the Class 1 Integron in *Salmonella* spp. isolates

Abstract,

Class 1 integron responsible for antimicrobial resistance has 3'CS conserved region composed of *qacEΔ1* and *sul1* genes, those genes confer resistance to quaternary amines and sulfonamides respectively. However from an epidemiological and antimicrobial resistance view exist variance in this 3'CS region genes which were identified of a great importance in these aspects, additionally *qacEΔ1* and *sul1* genes are found in *Salmonella* and among other microorganisms with the same antimicrobial resistance. We focused in our study to identify the class 1 integron and specifically the identification of distal region of class 1 integron from 77 *Salmonella* isolates obtained from swine, poultry and cattle. Forty percent of isolates shown class 1 integron, however these exhibited considerable diversity in their distal region, While the classical 3'CS was detected, deletions of this region were more common, either deleting the *sul1* gene, or both the *qacEΔ1* and *sul1* components, Of interest was an unusual distal region comprised of *qacH* and *sul3*. This region confers the same phenotypes as the originally described 3'CS, but with a different origin, which is yet to be explained. The variance in distal class 1 integron region was confirmed in our analysis that is responsible for the antimicrobial resistance and that is considered as a serious problem in human population health and limit the prevention, control and treatment of *Salmonella*.

Keywords: Microbial Drug Resistance, Integrons, Molecular characterization.

## Introducción.

*Salmonella* es uno de los principales patógenos asociado con enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) sobre todo de origen animal. En todo el mundo, la aparición de cepas de *Salmonella* resistente a antibióticos y desinfectantes, se ha convertido en una preocupación para la salud pública<sup>11</sup>. La multirresistencia se ha asociado con estructuras genéticas denominadas integrones. El integron clase 1 juega un papel muy importante en la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos<sup>5</sup>. La estructura típica de este integron consta de dos regiones conservadas y una región variable en donde son integrados diferentes genes de resistencia denominados genes casete<sup>19</sup>. La región 3'CS contiene los genes *qacEΔ1* y *sul1* que dan resistencia a compuestos amino-cuaternarios y a sulfonamidas respectivamente<sup>20,22</sup>. Sin embargo, en años recientes se ha reportado la presencia de los genes *qacH* y *sul3* en dicha región en *Salmonella*, *E. coli* y *Pseudomonas*<sup>23,25</sup>. Estos genes confieren la misma resistencia que los genes *qacEΔ1* y *sul1*<sup>1,4,5</sup>, aunque con una mayor capacidad de expresión. La resistencia a compuestos amino cuaternarios y a sulfonamidas es un problema en la salud pública debido a la dificultad en la prevención y tratamiento de este agente patógeno en animales y humanos<sup>24</sup>. Dado que los genes que se encuentran en los integrones son diseminados fácilmente por transferencia horizontal e incluso entre diferentes géneros bacterianos, es importante reconocer la presencia y distribución de estos para analizar la situación epidemiológica mundial de la resistencia a los antimicrobianos.

## **Material y Método.**

### **Cepas bacterianas.**

Se analizaron 77 aislamientos de *Salmonella* (Typhimurium (31), London (13), Bredeney (5), Typhi (4), Agona (4), Anatum (4), Senftenberg (4), Infantis (3), Enteritidis (1), Tennessee (1), Reading (1), B Monofasica (3), C1 Monofasica (1) y no tipificables (3)) obtenidos de canales de porcinos (58), aves (7) y bovinos (12) de rastros del centro norte del Estado de México, México. Las cepas fueron conservadas en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México hasta su estudio.

### **Extracción de ADN.**

La extracción de ADN se realizó a partir de dos a tres colonias bacterianas cultivadas en agar base sangre las cuales se diluyeron en 100 µl de un kit comercial de extracción de ADN Total (InstaGene™ Matrix, California, USA) las muestras se colocaron en baño maría a 56°C durante 30min, posteriormente se colocaron a 100°C durante 8 min, y finalmente se centrifugaron a 7000g durante 5 min. El ADN obtenido se conservó a -20°C hasta su utilización.

### **Detección de integron clase 1.**

Los iniciadores del gen de la integrasa clase 1 fueron: *intl1F* 5'CGA TGC GTG GAG ACC GAA ACC TT3' e *intl1R* 5'GTA ACG CGC TTG CTG CTT GGA TGC 3' los cuales amplifican un fragmento de 286 pb <sup>12</sup>.

La prueba de PCR se realizó utilizando PCR-Mix, Invitrogen (0.05 U/μL de Taq ADN polimerasa, 0.4 mM de cada dNTP y 4Mm de MgCl<sub>2</sub>), 1mM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 25μL. La amplificación se realizó con una desnaturalización a 94°C por 5 min. 30 ciclos con una desnaturalización 94°C por 1min, alineación a 59°C por 1min, extensión 72°C por 1min y una extensión final a 72°C por 10 min<sup>12</sup>. Los productos de PCR fueron visualizados usando geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio en un transiluminados de UV (UVP-II, USA).

#### **Detección de los genes *qacEΔ1* y *sul1*.**

Para determinar la presencia de los genes *qacEΔ1* y *sul1* se utilizaron los oligonucleótidos: *qacEΔF* 5' TAA GCC CTA CAC AAA TTG GGA GAT AT 3', *qacEΔ1R* 5'GCC TCC GCA GCG ACT TCC ACG 3' y *sulR* 5'-GGG TGC GGA CGT AGT CAG C-3' estos oligonucleótidos amplifican productos de 363 y 1,120 pb<sup>4</sup> respectivamente. La prueba de PCR se realizó utilizando PCR-Mix, Invitrogen (0.05 U de Taq ADN polimerasa, 0.4 mM de cada dNTP y 4Mm of MgCl<sub>2</sub>), 1mM de cada oligonucleótido y 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 25μL. La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial del ADN a 95°C por 5 min. 30 ciclos con una desnaturalización 95°C por 45 seg., alineación a 67°C por 45 seg., extensión a 72°C por 45 seg. y una extensión final a 72°C por 10 min. Las reacciones de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio analizado en un digitalizador de imágenes (UVP-II, USA)<sup>5,16</sup>.

### **Detección de los genes *qacH* y *sul3*.**

Para determinar la presencia de los genes *qacH* y *sul3* se utilizaron los oligonucleótidos: *qacHF* 5´ CTCGCACTCAAGTCCATCC 3´, *qacHR* 5´CTAACGATAAGTCCCATGCC 3´ y *sul3R* 5´CCGATGGAGGACTTTATTTA 3´ estos oligonucleótidos amplifican productos de 1000 y 2000 pb<sup>5</sup> respectivamente. La prueba de PCR se realizó utilizando la misma mezcla de las reacciones anteriores. La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial del ADN a 94°C por 5 min. 30 ciclos con una desnaturalización 94°C por 45 seg., alineación a 61°C por 3 min., extensión 72°C por 5min. y una extensión final a 72°C por 10 min. Las reacciones de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio analizado en un digitalizador de imágenes (UVP-II, USA)<sup>5,16</sup>.

### **Secuenciación.**

Los productos de PCR se purificaron empleando un kit comercial (Wizard Promega), obteniendo un volumen final de 35 µl de agua libre de nucleasas y 40 ng/µl de ADN como mínimo. Se realizó la secuenciación en MacroGen (Seoul, Corea del Sur). Las secuencias fueron alineadas y analizadas con el programa Mega5 y comparadas en la base de datos GenBank empleando el programa BLAST. Posteriormente las secuencias obtenidas fueron subidas a la base de datos del GenBank.

### **Resultados.**

El integron clase 1 (Figura 1) se identificó en 40% (31/77) de los aislamientos de *Salmonella*, 17 (54.8%) cepas fueron serovar Typhimurium, 4 (12.9%) *S. Senftenberg*, 3 (9.6%) *S. Agona*, 2(6.5%) *S.London* y 3 (9.6%) *S. Infantis*, 1 (3.2%) *S. Anatum* y 1

(3.2%) *S. Bredeney* (Tabla 1). La secuencia de los productos generados por PCR del gen de la integrasa clase 1 se pueden encontrar bajo los números de acceso de GenBank *KR677168* y *KR677159*. Para el caso de los genes *qacEΔ1/sul1* de la región distal del integron 1, 6(19.4%) cepas de *Salmonella* (Figura 1) presentaron ambos genes, de los cuales 3 fueron *S. Infantis*, 2 *S. Agona*, y 1 *S. Senftenberg* (Tabla1). Los genes *qacH/sul3* se presentaron en 7 (22.6%) (Figura 2) de las cepas analizadas, las cuales fueron *S. Typhimurium*; 11 (35.1%) cepas de *Salmonella* presentaron solo el gen *qacEΔ1* (Figura 1) de las cuales, 8 (72.7%) fueron *S. Typhimurium* (Tabla1). Por último 7 (22.6%) cepas de *Salmonella* que presentaron el integron 1 presentaron delección de los genes en la región distal del Integron 1 de las cuales 2 (28.6%) fueron *S. Typhimurium*, 2 (28.6) *S. London*, 1 (14.3%) *S. Bredeney* y 2 (28.6%) *S. Senftenberg*. Las secuencias de los productos de PCR de los genes encontrados en la región distal del integron clase 1 se pueden encontrar en el GenBank con los números de acceso descritos en la Tabla 1.

### **Discusión.**

El problema de multirresistencia a antimicrobianos y a desinfectantes en enterobacterias como *Salmonella* se ha dado principalmente por una presión de selección. En México, este proceso se puede atribuir al mal uso de los antibióticos, los cuales son de fácil acceso y sin restricciones para la venta en la medicina veterinaria<sup>8</sup>. Desde el surgimiento de los antibacterianos, los géneros bacterianos han desarrollado mecanismos de resistencia, los cuales se han relacionado a la creciente presencia de genes de resistencia y estructuras que facilitan la diseminación y expresión de estos genes como los integrones<sup>7,11</sup>. El integron clase 1 es el que se presenta con mayor

frecuencia en los géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *E. coli* y *Salmonella*, entre otros, y es uno de los principales mecanismos de resistencia antimicrobiana. En el presente estudio se encontró una frecuencia de 40% de integron clase 1 lo cual es similar a otros estudios como los realizados en Irán<sup>10</sup> y países bajos<sup>9</sup> donde la frecuencia fue de 43%; sin embargo, en comparación con otros países como Japón donde la frecuencia fue de 12.17%<sup>17</sup> la frecuencia que se encontró en el presente estudio fue mayor.

La estructura de la región 3´CS del integron clase 1 identificada en un principio está compuesta por los genes *sul1* de resistencia a sulfonamidas y el gen *Orf5* de lectura abierta de función desconocida<sup>20</sup>. Sin embargo, en 1993 se describió la inserción del gen casete *qacE* en esta región, al insertarse este gen, la porción terminal fue eliminada generándose una variante de dicho gen y que fue denominado *qacEΔ1* que da resistencia a compuestos amino cuaternarios mediante bombas de eflujo<sup>7</sup>. La región 3´CS del integron 1 (*qacEΔ1/sul1*)<sup>20</sup> tuvo una frecuencia de 19.4%, esta frecuencia es menor a la reportada en estudios realizados en Irán en donde el 100% de las cepas de *Salmonella* con presencia de integron 1 presentaron la región 3´CS.<sup>10</sup> Además, las cepas de *S. Typhimurium* con presencia de integron 1 en este trabajo no presentaron esta región 3´CS, por lo que se puede mencionar que el integron 1 que presentan las cepas estudiadas muestran deleciones de estos genes o la presencia de otros genes.

A partir del año 2007 se han reportado integrones clase 1 con una región distal compuesta por los genes *qacH/sul3*<sup>5,13</sup> los cuales confieren resistencia a compuestos amino cuaternarios y sulfonamidas. En este estudio encontramos la región distal compuesta por los genes *qacH/IS440/sul3* con una frecuencia de 22.6% en cepas con

integron 1 de las cuales el serovar Typhimurium fue el único que presentó esta región distal. Esta frecuencia es mayor a la reportada en cepas de *Salmonella* estudiadas en España en donde encontraron una frecuencia de 3.8%<sup>6</sup>. Estos datos podrían indicar que la región distal en las cepas de *Salmonella* de México podría ser más importante y estaría indicando una posible adaptación de estas piezas genéticas debido a que el gen *qacH* tiene mayor funcionalidad y eficiencia que el gen *qacEΔ1*<sup>15</sup>. En México las investigaciones de resistencia antimicrobiana se han enfocado principalmente a patógenos causantes de gastroenteritis<sup>21</sup> y se ha reportado la presencia de integrones clase 1 en aislamientos de *E. coli*<sup>2</sup>. Sin embargo, no hay reportes de los genes presentes en la región distal de este integron por lo que este es el primer reporte de esta región del integron 1 en cepas de *Salmonella* aisladas en México a partir de canales de porcino, bovinos y aves.

En el presente estudio se encontró una región distal con delección del gen *sul1*; es decir, solo contiene el gen *qacEΔ1* de resistencia a compuestos amino cuaternarios. Esta estructura se encontró en 35.6% de las cepas estudiadas, la delección de los genes *sul1* y *sul3* en esta estructura es mayor a la reportada en países bajos donde se ha encontrado un 10% de delección de estos genes en la región distal del integron 1<sup>14</sup>. Sin embargo, los genes *sul1* y *sul3* pueden encontrarse en la región variable de este integron y provocar la expresión de resistencia a sulfonamidas<sup>1</sup>.

Por último, 19.4% de las cepas con presencia de integron 1 presentan delección de ambos genes en la región distal de dicho integron, lo mismo que encontró de toro (2014) en España con solo el 1.2% de dichas delecciones.

## **Conclusiones.**

Los cambios genéticos constantes han provocado resistencia a los antibióticos en bacterias que causan problemas entéricos, incrementando la preocupación en la salud pública mundial, debido al aumento de cepas de *Salmonella* con presencia de integron 1, además, en la región distal de dicho integron se ha reportado la presencia o deleciones de uno o de ambos genes. Esto nos indica que la evolución de las bacterias y su adaptación genética y fenotípica para sobrevivir son factores que ayudan a la aparición de variantes en los integrones, que provocan que la terapia antimicrobiana y la desinfección no tengan los resultados esperados.

### Referencias.

1. Antunes P, Machado J, Peixe L. Dissemination of *Sul3*-Containing Elements Linked to Class 1 Integrons with an unusual 3' Conserved Sequence Region among *Salmonella* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51: 1545-1548.
2. Arriaga R, Talavera RM, Vazquez NJ, Soriano VE, Gutierrez CA. Presence of class I integrons in *Escherichia coli* isolated from meat products in Federal Inspection Type (TIF) plants in the Estado de Mexico. *Vet Méx.* 2013;44: 23-30.
3. Chuanchuen R, Koowatananukul Ch, Khemtong S. Characterization of Class 1 Integrons With Unusual 3' Conserved Region From *Salmonella enterica* Isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2008;39: 419-424.
4. Chuanchuen R, Khemtong S, Padungtod P. Occurrence of *QacE/QacEΔ1* Genes and Their Correlation with Class 1 Integrons in *Salmonella enterica* Isolates From Poultry and Swine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007;38: 855-862.
5. Curiao T, Cantón R, Garcillán- Barcia MP, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM. Association of composite *IS26-sul3* Elements with Highly Transmissible INCI1

- Plasmid in Extended-Spectrum- $\beta$ -lactamase-Producing *Escherichia coli* Clones from Humans. *Antimicrob Agents Chermother.* 2011;55: 2451-2457.
6. de Toro M, Seral C, Bezares BR, Torres C, Castillo FJ, Saéncz Y. Antibiotic resistance and virulence factors in clinical *Salmonella enterica* isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2014;32: 4-10.
  7. Dreser A, Wurtz VJ, Corbett KK, Echániz G. Antibiotic use in Mexico: review of problems and policies. *Salud Pública Méx.* 2008;50: S480-S487.
  8. Essen-Zandbergen A, Smith H, Veldman K, Mevius D. Occurrence and Characteristics of clas1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. In the Netherlands. *J Antimicrob Chermother.* 2007;59: 746-750.
  9. Estrada GT, Cerna JF, Pacheco GL, Velazquez RF, Ochoa TJ, Torres J, Dupont HL. Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1306-1308.
  10. Firoozeh F, Shahcheraghi F, Zahraei-Salehi T, Karami V, Aslani MM. Antimicrobial resistance profile and presence of class I integrons among *Salmonella enterica* serovars isolated from human clinical specimens in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2011;3: 112-117.
  11. Firoozeh F, Zahraei-Salehi T, Shahcheraghi F, Karimi V, Aslani MM. Characterization of class I integrons among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from Humans and poultry. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 64: 237-243.

12. Gillings MR, Holley MP, Stokes HW. Evidence for dynamic exchange of qac gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;296: 282-288.
13. Gillings MR. Integrons: Past, Present and Future. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78: 257-277.
14. Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Non-typhoidal *Salmonella enterica* Isolates. *Emerging Infectious Diseases.* 2009;15: 388-396.
15. Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Toh HS. Use of Inverse PCR for Analysis of Class 1 Integrons Carrying an Unusual 3' Conserved Segment Structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55: 943-945.
16. Leverstein-Van MAH, Paauw A, Box ATA, Blok HEM, Verhoef J, Fluit AC. Presence of Integron-Associated Resistance in the Community is Widespread and contributes to Multidrug Resistance in the hospital. *J Clin Microbiol.* 2002;40: 3038-3040.
17. Mahzounieh M, Khoshnood Sh, Ebrahimi A, Habibian S, Yaghoubian M. Detection of Antiseptic-Resistance Genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp. Isolated From Burn Patients. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2014;9: e15402.
18. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a novel *aad* Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44: 1568-1574.

19. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, Mammina C. High Prevalence of Integron-Mediated Resistance in Clinical Isolates of *Salmonella enterica*. *Jpn J Infect Dis*. 2010;63: 417-421.
20. Partridge AR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33: 757-784.
21. Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundstrom L, Skold O, Swedberg G, Skurray RA. The 3' Conserved Segment of Integrons Contains a Gene Associated with Multidrug Resistance to Antiseptics and Disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37: 761-768.
22. Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, Martínez S, Rojo BB, Zarazaga M, Torres C. Class 1 integrons lacking *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol*. 2010;144: 493-497.
23. Soufi L, Saénz Y, Vinué L, Salah AM, Ruiz E, Zarazaga M, Hassen AB, Hammami , Torres C. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulfonamide resistance genes and integrons. *Int J Food Microbiol*. 2011;144: 497-502.
24. Sunde M, Solheim H, Slettemas JS. Genetic linkage between class 1 integrons with the *dfrA12-orfF- aadA2* cassette array and *sul3* in *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 2008;130: 422-425.
25. Varela JAG, Talavera RM, Gutierrez CAC, Reyes RNE, Vazquez GJ. Phenotypic-genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the state of Mexico. *Trop Anim Health Prod*. 2013;45: 995-1000.

Tabla 1.- Genes *qacEΔ1*, *sul 1*, *qacH*, *sul 3* presentes en la region 3'CS del integron clase 1 presente en los aslamientos de *Salmonella* estudiados.

No. Aislamiento	<i>Salmonella</i> serovar	Origen	Integron 1	Region 3'CS del integron clase1.			Numero de Acceso del GenBank
				<i>qacEΔ1</i> , <i>sul 1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacH</i> , <i>sul 3</i>	
UAEM:MTR10	<i>S. Typhimurium</i>	Bovino	+	-	+	-	KR677151
UAEM:MTR11	<i>S. Typhimurium</i>	Bovino	+	-	+	-	KR677161
UAEM:MTR15	<i>S. Typhimurium</i>	Ave	+	-	+	-	KR677152
UAEM:MTR16	<i>S. Typhimurium</i>	Ave	+	-	+	-	KR677153
UAEM:MTR17	<i>S. Typhimurium</i>	Ave	+	-	+	-	KR677154
UAEM:MTR21	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	+	-	KR677155
UAEM:MTR23	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	+	-	KR677156
UAEM:MTR36	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	+	-	KR677157
UAEM:MTR14	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	+	KR677170
UAEM:MTR30	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	+	KR677171
UAEM:MTR33	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	+	KR677172
UAEM:MTR38	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	+	KR677173
UAEM:MTR39	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	+	KR677174
UAEM:MTR40	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	+	KR677175
UAEM:MTR42	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	+	KR677176
UAEM:MTR60	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	-	-
UAEM:MTR67	<i>S. Agona</i>	Porcino	+	-	+	-	KR677159
UAEM:MTR22	<i>S. Agona</i>	Porcino	+	+	-	-	KR677162
UAEM:MTR34	<i>S. Agona</i>	Porcino	+	+	-	-	KR677163
UAEM:MTR72	<i>S. Anatum</i>	Porcino	+	-	+	-	KR677160
UAEM:MTR62	<i>S. Bredeney</i>	Porcino	+	-	-	-	-
UAEM:MTR63	<i>S. Typhimurium</i>	Porcino	+	-	-	-	-

“Caracterización de integrones y casetes de resistencia a antimicrobianos y amino cuaternario en cepas de Salmonella aisladas en el Estado de México”

UAEM:MTR53	S. Senftenberg	Porcino +	-	+	-	KR677158
UAEM:MTR35	S. Senftenberg	Porcino +	+	-	-	KR677164
UAEM:MTR54	S. Senftenberg	Porcino +	-	-	-	-
UAEM:MTR65	S. Senftenberg	Porcino +	-	-	-	-
UAEM:MTR58	S. London	Porcino +	-	-	-	-
UAEM:MTR61	S. London	Porcino +	-	-	-	-
UAEM:MTR43	S. Infantis	Porcino +	+	-	-	KR677165
UAEM:MTR44	S. Infantis	Porcino +	+	-	-	KR677166
UAEM:MTR45	S. Infantis	Porcino +	+	-	-	KR677167
TOTAL		31	6(19.4%)	11(35.5%)	7(22.6%)	

Figura 1

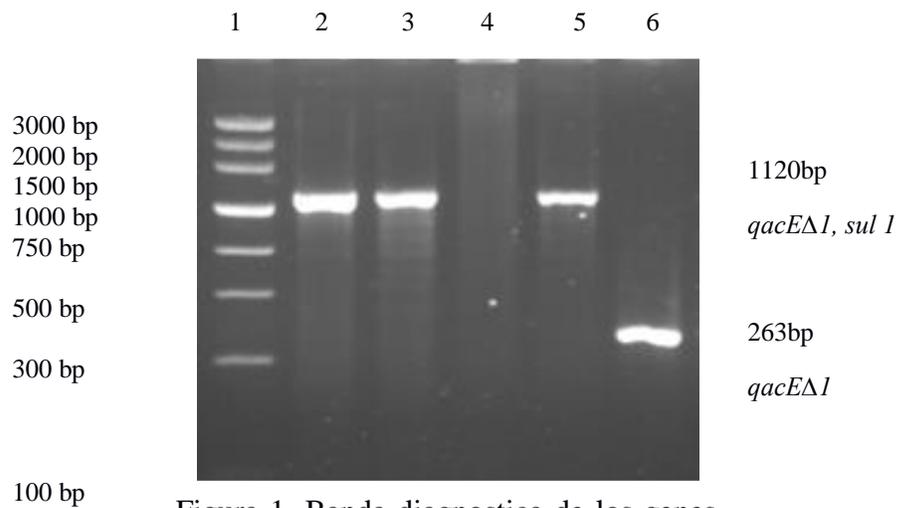


Figura 1. Banda diagnostica de los genes *qacEΔ1/sul1* en gel de agarosa al 1.5%: 1. Marcador de peso Molecular (CLP) 100-3000 bp, 2. *S. Infantis* 3. *S. Agona*, 4. *S. Agona*, 5. *S. B Monophasic*, 6. *S. Typhimurium*.

Figura 2.

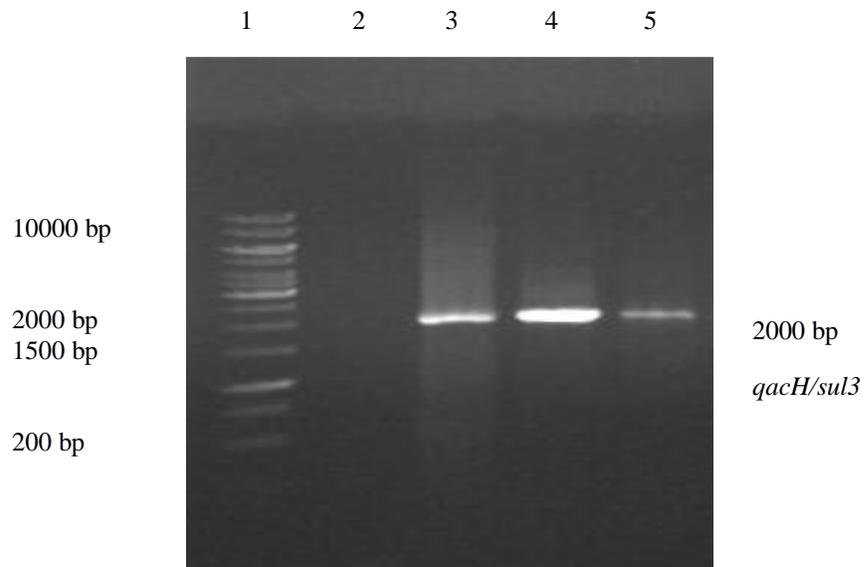


Figura 2. Bandas diagnosticas de los genes *qacH/sul3* en gel de agarosa al 1.5%. 1. Marcador de peso molecular (CLP) 200-10000 bp, 2. Control negativo, 3. *S. Typhimurium*, 4. *S. Typhimurium*, 5. *S. Typhimurium*.

## VIII. DISCUSION

La resistencia a los antimicrobianos ha tomado gran importancia en la salud, en el presente trabajo se encontraron 14 (73.68%) cepas que presentaron el gen *Pse-1*, de las cuales expresaron resistencia fenotípica, este gen se encuentra en el cromosoma o en el plásmido bacteriano y provee de resistencia fenotípica a  $\beta$ -lactámicos (Chiu *et al.* 2006; Fladynova *et al.*, 2003). La presencia del gen *Pse-1* en el presente estudio es similar a los mencionados por Fladynova *et al.*, 2003 en cepas aisladas en República Checa, sin embargo ambos resultados fueron mayores a los encontrados por Chiu *et al.*, 2006 y Randall *et al.*, 2003 los cuales reportaron un 51% y 25% respectivamente en cepas aisladas de Francia y Reino Unido; aunque, fueron menores a los reportados por Weill *et al.*, 2006, Beutlich *et al.*, 2010 y Herrero *et al.*, 2006, los cuales obtuvieron 94%, 82% y 91% respectivamente en cepas de *Salmonella* aisladas en Francia, Alemania y España. En relación a la cepa que presentó el gen *Pse-1*, que mostró sensibilidad fenotípica a la ampicilina; podemos mencionar que posiblemente éste microorganismo no ha sido expuesto a una presión selectiva, donde se vea obligado a expresar el gen. Con respecto a las 5 cepas que no presentaron el gen *Pse-1*, pero sí mostraron resistencia fenotípica, podemos mencionar que la resistencia puede estar relacionada con otros genes como el *TEM* y *OXA-30* que también confieren resistencia a  $\beta$ -lactámicos (Beutlich *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2006; Weill *et al.*, 2006).

Con relación a la resistencia a estreptomycin, tenemos que 14 (51.85%) cepas presentaron el gen *STR*, el cual proporciona resistencia al grupo de aminoglucosidos (Chiu *et al.*, 2006; Randall *et al.*, 2004), éstos resultados son mayores a los encontrados por Fladynova *et al.*, 2003, Randall *et al.*, 2004 y Chiu *et al.*, 2006; los cuales encontraron 17%, 50% y 51% respectivamente en cepas de *Salmonella* aisladas en países europeos. De las 6 cepas que presentaron resistencia, pero no el gen *STR*, podemos decir, que la resistencia puede estar ligada a una modificación de las proteínas ribosomales la cual inactiva la estreptomycin (Robicsek *et al.*, 2006).

Para el caso de la resistencia al florfenicol, encontramos 2 (7.4%) cepas que presentaron el gen *FloR*, sin embargo, éstas 2 cepas fueron sensibles al antimicrobiano; el resultado obtenido es menor a lo reportado por Chiu *et al.*, 2006, Faldynova *et al.*, 2003, Randall *et al.*, 2004 y Beutlich *et al.*, 2010 en donde encontraron 51%, 79%, 66% y 9% respectivamente en cepas de *Salmonella* aisladas en países europeos. Para el caso de las 3 cepas que presentaron resistencia, pero no el gen *FloR*, la resistencia podría estar ligada a otros genes como *catA1* y *cmlA1* (Beutlich *et al.*, 2010), o a los genes *Ffc*, *pp-flo*, *cfr* y *fexA*, o también, al plásmido de resistencia R55 (Ma *et al.*, 2007).

Respecto a la resistencia a tetraciclina 11 (41%) cepas presentaron el gen *tetG*; este resultado es mayor al encontrado por Beutlich *et al.*, 2010 el cual no encontró este gen en las cepas estudiadas en Alemania; sin embargo, son menores a los reportados por Chiu *et al.*, 2006, Faldynova *et al.*, 2003 y Randall *et al.*, 2004, en donde encontraron un 51%, 79% y 49% respectivamente en cepas aisladas en países europeos. Para el caso de las 6 cepas que no presentaron el gen *tetG*; pero que sí presentaron resistencia a tetraciclina podemos decir, que se podría relacionar con otros genes de resistencia como *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tete* (Beutlich *et al.*, 2010; Frech *et al.*, 1998; Henriquez *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2004).

En relación a la resistencia al ácido nalidíxico 1 (3.7%) cepa presentó el gen *qnrS*, el cual proporciona resistencia en enterobacterias a quinolonas o fluoroquinolonas (Hopkins *et al.*, 2007; Robicsek *et al.*, 2006); sin embargo, este gen que se encuentra en el ADN plasmídico tuvo una baja presencia en las cepas estudiadas, este resultado es similar al reportado por Beutlich *et al.*, 2010, Hopkins *et al.*, 2007 y Robicsek *et al.*, 2006; de las 11 cepas que presentaron resistencia, pero no presentaron el gen *qnrS* podemos mencionar que la resistencia puede estar dada por otros genes de resistencia como lo es el *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y más que nada puede estar relacionado con la mutación del gen *GyrA* (Talavera *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008).

Lo mencionado anteriormente es una preocupación para la salud pública, más aún, porque las cepas estudiadas presentaron multirresistencia a ampicilina, florfenicol, estreptomina, tetraciclina, sulfonamidas y ácido nalidíxico, sin embargo dos de estos genes estudiados Pse-1 y STR son factores importantes para la resistencia fenotípica a los antimicrobianos anteriormente mencionados; los demás genes estudiados no son un factor importante para la resistencia, aunque existen otros genes que podrían estar ligados a la resistencia presentada por las cepas estudiadas.

En el presente estudio también se encontraron cepas que presentaron genes de resistencia, pero no resistencia fenotípica a los antimicrobianos, esto podría estar relacionado a que algunos genes de resistencia no contienen un promotor dentro de su región codificante; sin embargo, desde 1989 se han reportado estructuras con la capacidad de integración, las cuales, pueden integrar el gen de resistencia y proveerlo de un promotor para facilitar la expresión fenotípica de dicho gen.

En México, este proceso de multirresistencia se puede atribuir al mal uso de los antibióticos, los cuales son de fácil acceso y sin restricciones para la venta en la medicina veterinaria (Estrada *et al.*, 2005). Desde el surgimiento de los antibacterianos, los géneros bacterianos han desarrollado mecanismos de resistencia, los cuales se han relacionado a la creciente presencia de genes de resistencia y estructuras que facilitan la diseminación y expresión de estos genes como los integrones (Essen *et al.*, 2007). El integron clase 1 es el que se presenta con mayor frecuencia en los géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *E. coli* y *Salmonella*, entre otros, y es uno de los principales mecanismos de resistencia antimicrobiana. En el presente estudio se encontró una frecuencia de 40% de integron clase 1, lo cual es similar a otros estudios como los realizados en Irán (Firoozeh *et al.*, 2012) y países bajos (Firoozeh *et al.*, 2011) donde la frecuencia fue de 43%; sin embargo, en comparación con otros países como Japón donde la frecuencia fue de 12.17% (Partridge *et al.*, 2009) la frecuencia que se encontró en el presente estudio fue mayor.

Para el caso de la frecuencia de resistencia fenotípica de los aislamientos de *Salmonella* que fueron positivos a la integrasa clase 1, todos presentaron multiresistencia a más de 2 antimicrobianos como a estreptomicina, ampicilina, tetraciclina, gentamicina, cloranfenicol, trimetoprim y sulfametoxazol. Sin embargo, en la resistencia genotípica solo se encontraron los genes casete *dfrA17*, *dfrA12* genes de resistencia a trimetoprim y los genes *aaA1*, *aaA2* y *aaA5* de resistencia a estreptomicina. Las combinaciones que se identificaron fueron *dfrA17-aaA5* y *dfrA12-aaA2*, lo que demuestra que esta pieza genética puede contener más de un gene casete en su región variable como lo mencionan Shen *et al.* (2010) y Sinwat *et al.* (2015) en donde reportaron combinaciones similares a las encontradas en el presente estudio. La posición de los genes casetes con respecto al promotor no tuvo diferencias en la expresión de resistencia fenotípica, por lo que podemos mencionar que no tiene relevancia la posición en la que se encuentren los genes casete en la región variable. Sin embargo, se identificaron aislamientos con multiresistencia fenotípica con integron clase 1, pero que no presentan genes casete en la región variable que codifique para la resistencia, por lo que podemos mencionar que la multiresistencia que presentan estos aislamientos podría estar relacionado a otros factores genéticos como los transposones mencionados en el trabajo de Firoozeh *et al.* (2011) o por genes de resistencia que no se encuentran relacionados a los integrones.

La estructura de la región 3'CS del integron clase 1 identificada en un principio está compuesta por los genes *sul1* de resistencia a sulfonamidas y el gen *Orf5* de lectura abierta de función desconocida. Sin embargo, en 1993 se describió la inserción del gen casete *qacE* en esta región, al insertarse este gen, la porción terminal fue eliminada generándose una variante de dicho gen y que fue denominado *qacEΔ1*, que da resistencia a compuestos amino cuaternarios mediante bombas de eflujo (Essen *et al.*, 2007). La región 3'CS del integron 1 (*qacEΔ1/sul1*) tuvo una frecuencia de 19.4%, esta frecuencia es menor a la reportada en estudios realizados en Irán en donde el 100% de las cepas de *Salmonella* con presencia de integron 1 presentaron la región 3'CS (Firoozeh *et al.*, 2012) Además, las cepas de *S. Typhimurium* con

presencia de integron 1 en este trabajo no presentaron esta región 3´CS, por lo que se puede mencionar que el integron 1 que presentan las cepas estudiadas muestran delecciones de estos genes o la presencia de otros genes.

A partir del año 2007 se han reportado integrones clase1 con una región distal compuesta por los genes *qacH/sul3* (Curiano *et al.*, 2011), los cuales confieren resistencia a compuestos amino cuaternarios y sulfonamidas. En este estudio encontramos la región distal compuesta por los genes *qacH/IS440/sul3* con una frecuencia de 22.6% en cepas con integron 1 de las cuales el serovar Typhimurium fue el único que presentó esta región distal. Esta frecuencia es mayor a la reportada en cepas de *Salmonella* estudiadas en España en donde encontraron una frecuencia de 3.8% (de Toro *et al.*, 2014). Estos datos podrían indicar que la región distal en las cepas de *Salmonella* en México podría ser más importante y estaría indicando una posible adaptación de estas piezas genéticas, debido a que el gen *qacH* tiene mayor funcionalidad y eficiencia que el gen *qacEΔ1*. En México las investigaciones de resistencia antimicrobiana se han enfocado principalmente a patógenos causantes de gastroenteritis y se ha reportado la presencia de integrones clase 1 en aislamientos de *E. coli* (Fuentes *et al.*, 2013). Sin embargo, no hay reportes de los genes presentes en la región distal de este integron, por lo que este es el primer reporte de esta región del integron 1 en cepas de *Salmonella* aisladas en México a partir de canales de porcino, bovinos y aves.

En el presente estudio se encontró una región distal con delección del gen *sul1*; es decir, solo contiene el gen *qacEΔ1* de resistencia a compuestos amino-cuaternarios. Esta estructura se encontró en 35.6% de las cepas estudiadas, la delección de los genes *sul1* y *sul3* en esta estructura es mayor a la reportada en países bajos donde se ha encontrado un 10% de delección de estos genes en la región distal del integron 1 (Lee *et al.*, 2011). Sin embargo, los genes *sul1* y *sul3* pueden encontrarse en la región variable de este integron y provocar la expresión de resistencia a sulfonamidas (Antunes *et al.*, 2007).

Por último, 19.4% de las cepas con presencia de integron 1 presentan delección de ambos genes en la región distal de dicho integron, lo mismo que encontró de Toro *et al.* (2014) en España con solo el 1.2% de dichas delecciones.

## IX. CONCLUSIONES

1. El gen con mayor prevalencia en las cepas de *Salmonella* aisladas de canales de bovinos fue el gen *pse-1*.
2. El gen *pse-1* fue expresado por 15 cepas de las cuales 14 fueron resistentes a ampicilina.
3. El gen *str* fue expresado por 14 cepas aisladas de canales de bovino de las cuales 14 fueron resistentes a estreptomina.
4. El gen *floR* fue expresado por 2 cepas de las cuales 2 fueron sensibles al florfenicol, por lo que se considera que este gen no es necesario para que las cepas estudiadas de *Salmonella* expresen resistencia al florfenicol.
5. El gen *tetG* fue expresado por 9 cepas aisladas de canales de bovinos de las cuales 3 fueron resistentes a tetraciclina y 6 fueron sensibles al antimicrobiano mencionado debido a esto se considera que este gen no es necesario para la presencia de resistencia a tetraciclina en las cepas estudiadas.
6. El gen *qnrS* fue expresado por 1 cepa la cual presentó resistencia al ácido nalidíxico.
7. Debido a la baja presencia del gen *qnrS* se considera que este gen no es necesario para la presencia de resistencia a fluoroquinolonas en las cepas de *Salmonella* aisladas de canales de bovinos.
8. El integron case 1 se encontró con una frecuencia de 40%
9. Se encontraron los genes *dfrA17* y *dfrA12* de resistencia a trimetoprima 22.6 % y 16% respectivamente.
10. El gen *aadA1* de resistencia a aminoglucósidos se encontró en una frecuencia de 12.9%.
11. El gen *aadA2* de resistencia a aminoglucósidos se encontró en una frecuencia de 35.5%.
12. El gen *aadA5* de resistencia a aminoglucósidos se encontró en una frecuencia de 16%.
13. Todos los aislamientos que presentaron estos genes expresaron resistencia tanto a trimetoprim como a aminoglucósidos

14. En la región conservada 3´CS se encontraron genes diferentes a los reportados
15. Los genes *qacEΔ1/sul1* se encontraron con una frecuencia 19.3%
16. Los genes *qacH/sul3* se encontraron con una frecuencia de 22.6% de los cuales todos fueron serovar Typhimurium-
17. Se encontraron deleciones de uno o ambos genes clásicos (*qacEΔ1/sul1*) de la región 3´CS del integron clase 1.

## X. LITERATURA REVISADA

- Ahmed AM, Nakano H, Shimamoto T. Molecular Characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55: 371-374.
- Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 297-304.
- Antunes P, Machado J, Peixe L. Dissemination of *Sul3*-Containing Elements Linked to Class 1 Integrons with an unusual 3' Conserved Sequence Region among *Salmonella* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51: 1545-1548.
- Beutlich J, Rodriguez I, Schroeter A, Käsbohrer A, Helmuth R, Guerre B. A Predominant Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Saintpaul Clonal Line in German Turkey Food Products. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(11):3657-3667.
- Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons; mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* 2007; 15: 301-309.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. (2000): *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2465-2467.
- Brenner MG, Cardoso M, Schwarz S. Class 1 integron- associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55: 776-779.
- Cabrera R, Marco F, Vila J, Ruíz J, Gascón, Class 1 integrons in *Salmonella* strains Causing Traveler's Diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1612-1613.
- Cavaco LM, Frimodt MN, Hasman H, Guardabassi L, Nielsen L, Aarestrup FM. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb Drug Resist.* 2008; 14: 163-169.

- Center for disease control and prevention CDC. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary. 2005. Atlanta- Georgia: US Department of Health and Human Services. CDC. 2007.
- Centrón D y Roy PH. Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia mecesens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. *Antimicrob Agents Chemoth.* 2002; 46: 1402-1409.
- Chang CY, Chang LL, Chang YH, Lee TM, Chang SF. Characterisation of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. *J Med Microbiol.* 2000; 49: 1097-1102.
- Chattoraj DK. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol Microbiol.* 2000; 37:467-476.
- Chiu CH, Su LH, Chu CH, Wang MH, Yen CM, Welli FX, Chu C. Detectinon of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* phage types DT102, DT104, and U302 by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(7): 2354-2358.
- Chuanchuen R, Khemtong S, Padungtod P. Occurrence of *qacE/qacEΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from Poultry and Swine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007; 38: 855-862.
- Chuanchuen R, Koowatananukul C, Khemtong S. Characterization of class 1 integron with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Helath.* 2008; 39: 419-424.
- Cordiés JL, Machado RLA, Mhamilton CML. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Medica.* 1998; 8: 13-27.
- Córdova B C. Estudio de Resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella enterica* seritipos Enteritidis, Typhi, Gallinarum Aisladas de Aves y Humanos. Tesis de Especialidad. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, Mexico; 2008.
- Curiao T, Cantón R, Garcillán- Barcia MP, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM. Association of composite *IS26-su13* Elements with Highly Transmissible Inc11

Plasmid in extended-spectrum-beta-lactamase-Producing *Escherichia coli* Clones from Humans. *Antimicrob Agents Chermother.* 2011; 55: 2451-2457.

de Toro M, Seral C, Bezares BR, Torres C, Castillo FJ, Saénz Y. Antibiotic resistance and virulence factors in clinical *Salmonella entérica* isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2014;32: 4-10.

De Vinney R, Steele MO, Finlay BB. Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial phatogens. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 29-33.

Di conza JA, Gutkind GO. Integrones: los coleccionistas de genes. *Rev Argent Microbiol.* 2010; 42: 63-78

Donland RM y Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167-193.

Espinoza E, Revollo S, Espada A. Identificación de *Salmonella* spp. mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidado (nested PCR) y técnica convencionales en huevos recolectados en los principales mercados de la ciudad de La Paz. *Vision Científica.* 2007; 1:10-16.

Essen ZA, Smith H, Veldman K, Mevius D. Occurrence and Characteristics of clas1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. *J Antimicrob Chermother.* 2007;59: 746-750.

Estrada GT, Cerna JF, Pacheco GL, Velazquez RF, Ochoa TJ, Torres J, DuPont HL. Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:1306-1308.

European Commission (2004): Trends and sources of zoonotic agents in animals, feeding stuffs, food and man in the European Union and Norway in 2002. European Commission, health and consumer protection directorate-general. Sanco/29/2004.

Ezaki T, Kawamura Y, Yabuuchi E. Recognition of nomenclature standing of *Salmonella typhi* (Approved List 1980), *Salmonella enteritidis* (Approved list 1980), and *Salmonella typhimurium* (Approved List 1980), and conservation of the specific

epithets enteritidis and typhimurium, request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50: 945-947.

Feschotte C y Pritham EJ. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annu Rev Genet.* 2007; 41:331-368.

Figueroa OIM y Verdugo RA. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 2005; 47: 25-42.

Firoozeh F, Shahcheraghi F, Zahraei-Salehi T, Karami V, Aslani MM. Antimicrobial resistance profile and presence of class I integrons among *Salmonella enterica* serovars isolated from human clinical specimens in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2011;3: 112-117.

Firoozeh F, Zahraei-Salehi T, Shahcheraghi F, Karimi V, Aslani MM. Characterization of class I integrons among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from Humans and poultry. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 64: 237-243.

Fladynova M, Pravcova M, Sisak F, Havlickova H, Kolackova I, Cizek A, Karpiskova R, Rychilk I. Evolution of Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains Isolated in Czech Republic between 1984 and 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(6):2002-2005.

Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integron, gene cassette, mobility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; 18(11): 761-770.

Frech G y Schwarz S. Tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Dublin. *Antimicrob Agents Chermother* 1998; 42(5):1288-1289.

Fruchs LY, Chihu L, Conde C, González VM, Noguez AH, Calderon E, Avonce N, Ovando C. Mecanismos Moleculares de la Resistencia Bacteriana. *Salud Pública Méx.* 1994; 36 (4): 428-438.

Fuentes AR, Talavera RM, Vazquez NJ, Soriano VE, Gutierrez CA. Presence of class I integrons in *Escherichia coli* isolated from meat products in Federal Inspection Type (TIF) plants in the Estado de Mexico. *Vet Méx.* 2013;44: 23-30.

- Galán, J.E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microb.* 1996; 20 (2): 263-271.
- Gill CO. Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Sci.* 2007; 77(2): 149-160.
- Gillings MR, Holley MP, Stokes HW. Evidence for dynamic exchange of *qac* gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 296 (2): 282-288.
- Gillings MR. Integrons: Past, Present and Future. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014; 78 (2): 257-277.
- Goosney DL, Knoechel DG, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella*: Master of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerging Infect Dis.* 1999; 5 (2): 216-223.
- Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Lucarelli C, Owczarek S, Ricci A, Mancin M, Caprioli A, Luzzi I. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Vet Microbiol.* 2008; 128 (3-4) : 414-418.
- Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilera PP, Gonzalez AMC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de Méx.* 2000; 42 (6): 490-495.
- Henriquez IS, Fonseca F, Aviles A, Saavedra MJ, Correia A. Tetracycline-resistance genes in Gram-negative isolates from estuarine waters. *Lett Appl Microbiol.* 2008; 47(6): 526-533.
- Hernández JS, Zuñiga EA, Sánchez OI, Castro RJ, Román GAD, Santos LEM. Microbiological conditions during the slaughter process at a municipal slaughterhouse in Hidalgo, Mexico. *Vet Méx.* 2007; 38 (2): 187-195.
- Herrero A, Rodicio MR, González HMA, Mendoza MC. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid P<sub>uo</sub>-StVR2. *J Antimicrobiol Chemother* 2006; 57:39-45.

- Hopkins KL, Wootton L, Day MR, Threlfall EJ. Plasmid-mediate quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. J Antimicrob Chemother. 2007; 59 (6): 1071-1075.
- Humphries AD, Townsend SM, Kingsey RA, Nicolson TL, Tsolis RM, Bäumlér AJ. Role of Fimbriae as antigens intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. FEMS Microbiol Lett. 2001; 201 (2): 121-125.
- Inocencio V A G. Resistencia a Antimicrobianos y Presencia de Integrones en aislados de *Salmonella* entérica obtenidos de Productos Cárnicos y Lácteos en el Estado de Michoacán. Tesis Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacan; 2011.
- Jaglic Z y Cervinkova D. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds-the *qac* genes and their role a review. Vet Med. 2012; 57 (6): 275-281.
- Jawetz, E; Melnick, J y Adelberg, E. 2005. Microbiología Médica. 2005. E.d. El manual Moderno. 18ª edición. Mexico.
- Jin Y y Lin JM. Prevalence of Integrons in Antibiotic-Resistant *Salmonella* spp. In Hong Kong. Jpn J Infect Dis. 2009; 62 (6): 432-439.
- Karatzas KA, Randall LP, Webber M, Piddock LJ, Humphrey TJ, Woodward MJ, Coldham NG. Phenotypic and proteomic Characterization of Multiply Antibiotic-Resistant Variants of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Selected Following Exposure to Disinfectants. Appl Environ Microbiol. 2008; 74 (5): 1508-1516.
- Klan AA, Ponce E, Nawaz MS, Cheng CM, Klan JA, West CS. Identification and Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from imported seafood. Appl Environ Microbiol. 2009; 75 (4): 1192-1196.
- Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Non-typhoidal *Salmonella enterica* Isolates. Emerg Infect Dis. 2009; 15 (3): 388-396.

- Kidwell, M.G. Transposable elements. *The Evolution of the Genome*. 2005. ed. T.R. Gregory. San Diego. pp. 165-22.
- Kumar CG y Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*. 1998; 42 (1-2):9-27.
- Lederberg J. *Cell Genetics and Hereditary Symbiosis*. Reprinted from *Phyological Reviews*. 1952; 32 (4): 403-408
- Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Toh HS. Use of Inverse PCR for Analysis of Class 1 Integrons Carrying an Unusual 3' Conserved Segment Structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(2): 943-945.
- Lévesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR Mapping of Integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 185-191.
- Ma M, Wang H, Yu Y, Zhang D, Liu S. Detection of antimicrobial resistance genes of pathogenic *Salmonella* from Swine with DNA microarray. *J Vet Diagn Invest*. 2007; 19 (2):161-167.
- Mangalappalli AK y Korber DR. Adaptative Resistance and Differential Protein Expression of *Salmonella* enteric Serovar Enteritidis Biofilms Exposed to Benzalkonium Chloride. *Antimicrob Agentes Chemother*. 2006; 50 (11): 3588-3596.
- Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect*. 2000; 2 (2): 145-156.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44 (6): 1568-1574.
- McClintock B. *Mutable Loci in Maize*. Carbegie Institution of Washington. 1948; 155-169.
- Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chermother*. 2005; 56 (6): 1025-1033.

- Moellering RC. Antibiotic Resistance: Lessons for the Future. *Clin Infect Dis.* 1998; 27: S135-S140.
- Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer’s patches in murine typhoid model. *J Exp Med.* 2000; 192 (2):249-258.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. 10 ed. vol. 29, no. 3. Approved standard M100-S19. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, P.A. 2009.
- Nikaido, H. Antibiotic resistance caused by gram negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis.* 1998; 27: S32-S41.
- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Métodos para la determinación de *Salmonella* en alimentos. 1994.
- Paniagua GL, Monroy E, García GO, Alonso J, Negrete E, Vaca S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals of Clin Microbiol Antimicrob.* 2007; 6: 1-8.
- Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson ND, Pickard D, Wain J, Churcher C, Mungall KL, Bentley SD, Holden MTG, Sebaihia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connor P, Cronin A, Davis P, Davies RM, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien TT, Holroyd S, Jagels K, Krogh A, Larsen TS, Leather S, Moule S, O’Gaora P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enteric* serovar Typhi CT18. *Nature.* 2001; 413 (6858): 848-852.
- Parry MC, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid Fever. *N. England Journal of Medicine.* 2002; 347: 1770-1780.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33 (4): 757-784.

- Prescott JF, Baggott JD, Walker RD. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. 3<sup>a</sup> ed., Intermedica, Madrid, España. 2002.
- Pritham EJ. Transposable Elements and Factors influencing their Success in Eukaryotes. *J Hered*. 2009; 100 (5): 648-655.
- Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJV, Woodward. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemoter*, 2004; 53(2):208-216.
- Recchia GD y Hall RM. Gene Cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*. 1995; 141 (Pt 12): 3015:3027.
- Reeves WM, Evins MG, Heiba AA, Plikaytis DB, Farmer JJ. Clonal Nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. Nov. *J Clin Microbiol*. 1989; 27 (2): 313-320.
- Reyes H y Navarro P. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. *Antib Inf*. 1998; 2 (12): 12-19.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby A, Hooper DC. *qnr* Prevalence in ceftazidime-Resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chermother*. 2006; 50(8): 2872-2874.
- Sabate M y Parts G. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clín*. 2002; 20 (7): 341-345.
- Salyers, A. y Whitt,D. *Bacterial pathogenesis. A molecular Approach*. 2002. 2ed ASM press. Washington, D.C.
- Sánchez JMM, Cardona CNM. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asociación Colombiana de Infectología*. 2003; 7: 22-29.
- Sarwari AR, Magder LS, Levine P, McNamara AM, Knower S, Armstrong GL, Etzal R, Hollingsworth J, Morris JG. Serotype Distribution of *Salmonella* Isolates from food

animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. *J Infect Dis.* 2001; 183 (8):1295-1299.

Shen D, Xu Y, Pan S, Li Y, Lu Y, Xu T, Xia W, Liu G, Gu B. Prevalence and characterization of class 1 integrons in multi-drug resistant *Salmonella* sp. from China in 2010. *J Chemother.* 2015; 27: 57- 60.

Sinwat N, Angkittitrakul S, Chuanchuen R. Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated from Pork, Chicken Meat, and Humans in Northeastern Thailand. *Foodborne Pathog Dis.* 2015; 12 (9): 759.765.

Srikanth CV, Wall DM, Maldonado CA, Shi HN, Zhou D, Demma Z, Mumy KL, McCormick BA. *Salmonella* Pathogenesis and processing of secreted effectors by caspase-3. *Science.* 2010; 330 (6002): 390-393.

Stanchi O. *Microbiología Veterinaria. Primera Edición.* Editorial Intermedica. Buenos Aires-Republica Argentina.2007; 210-214

Su LH y Chiu CH. *Salmonella* Clinical Importance and Evolution or Nomenclature. *Chang Gung Med J.* 2007; 30 (3): 210-218.

Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología.* 2008; 12 (3): 217-226.

Talavera RM, Vazquez ChJC, Flores BR, Robles GF, Lagunas BS, Alonso FMU. GyrA gene mutations and fluoroquinolone resistance in *Salmonella* isolates from pigs in central Mexico. *Vet Rec.* 2007; 160 (18): 630-632.

Tenover FC. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med.* 2006; 119:s3-s10.

Terragno R, Caffer M, Brunas S y Binsztein, N. *Manual de procedimientos. Salmonella: Parte I. Aislamiento, Identificación y serotipificación.* Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Global Salm-Surv y CDC. 2003. Buenos Aires Argentina.

Terragno R. y Caffer. *Manual de procedimientos Salmonella: I.N.E. 2001. Argentina.*

- Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005; 55: 521-524.
- Vila J, Martí S, Sánchez CJ. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2007; 59 (6): 1210-1215.
- Weill FX, Guesnier F, Guibert V, Timinouni M, Demartin M, Polomack L, Grimont PA. Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium from Humans in France (1993 to 2003). J Clin Microbiol. 2006; 44(3):700-708.
- Wessler SR. Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. PNAS. 2006; 103 (47): 17600-17601.
- White PA, McIver CJ, Deng YM, Rawlinson. Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *drfA17*. FEMS Microbiol Lett. 2000; 182 (2): 265-269.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgate M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schumal AH. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nat Rev Genet. 2007; 8 (12): 973-982.
- Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Postgrad Med J. 2002; 78 (918): 216-224.
- Yañez E, Mattar S, Durango A. Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Asociación Colombiana de Infectología. 2008; 12 (4): 246-254.
- Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from nine Teaching Hospitals in China. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(12):4268-4263.

Zaidi MB, Clava JJ, Estrada GMT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott J, Zhao S, McDermott P, Tollefson L. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14 (3): 429-435.

Zaidi MB, Lopez MC, Calva E. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2006; 48 (2): 121-125.