

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA-FENOTÍPICA GENOTÍPICA EN
CEPAS DE *Salmonella entérica* spp. AISLADAS DE CANINOS EN EL
MUNICIPIO DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO
EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA

CAROLINA RIVERA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS

DR. TOMÁS BENJAMÍN RENTERÍA EVANGELISTA

MEXICALI, B. C. MÉXICO

AGOSTO 2019

Susceptibilidad antimicrobiana fenotípica-genotípica en cepas de *Salmonella enterica* spp. Aisladas de caninos en el municipio de Mexicali, Baja California, México. Tesis presentada por la C. Carolina Rivera García como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el siguiente comité:

Dr. TOMÁS BENJAMÍN RENTERÍA EVANGELISTA

Director de tesis

Dr. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

Asesor

Dra. SAWAKO HORI-OSHIMA

Asesor

Dr. JOSÉ CARLOMÁN HERRERA RAMÍREZ

Asesor

M.C. LOURDES CAROLINA PUJOL MANRÍQUEZ.

Asesor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca para poder llevar a cabo mi proyecto de investigación.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) por brindarme sus instalaciones y material para la realización del proyecto.

Agradezco por todo el apoyo brindado a mi asesor de tesis Dr. Tomas Benjamín Rentería Evangelista y a mis asesores Dra. Sawako Hori-Oshima, Dr. Gerardo Medina Basulto, Dr. José Carlomán Herrera Ramírez, y a la M.C Lourdes Carolina Pujol Manríquez.

A mis compañeros de posgrado que me apoyaron en este proyecto.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Antecedentes	5
Epidemiología	6
Etiología	7
Patogenia	8
Factores de virulencia.....	9
Plásmidos y profagos	10
Fimbrias y flagelos.....	10
Diagnóstico clínico	11
Métodos Bacteriológicos	11
Métodos serológicos.....	12
Métodos inmunológicos	12
Métodos moleculares	13
PCR	13
Resistencia a agentes antimicrobianos.....	13
Transmisión de genes de resistencia	14
Pruebas de resistencia a antibióticos.....	16
MATERIALES Y METODOS	18
Ubicación del área de estudio.....	18
Tipo de estudio	18
Recolección de muestra.....	18
Análisis de laboratorio	18
Pre-enriquecimiento	18
Enriquecimiento.....	18

Medio selectivo.....	19
Pruebas bioquímicas	19
Kirby Bauer método de difusión en disco	19
Preparación del agar Müller Hinton.....	19
Preparación del inóculo	20
Inoculación de las placas.....	20
Aplicación de los discos.....	20
Incubación.....	20
Lectura del disco	21
Identificación molecular de <i>Salmonella</i> spp. y de los genes de resistencia antimicrobiana ...	21
Extracción del ADN bacteriano	21
Detección del gen <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> spp.	22
Tipificación de <i>Salmonella</i> utilizando PCR Multiplex	25
Caracterización de genes de resistencia <i>cmlA/tet</i> TEM, PSE, <i>SipB/Ca</i>	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Detección del gen <i>invA</i>	32
Detección de genes <i>typh</i> y <i>ENT</i>	34
Antibiograma	36
Detección de <i>cmlA/tet</i> , <i>SipB/C</i> , PSE y TEM.....	39
CONCLUSIONES.....	47
LITERATURA CITADA	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
Cuadro I	Iniciadores para la amplificación del gen <i>invA</i>	23
Cuadro II	Condiciones de termociclador para detección de gen <i>invA</i>	24
Cuadro III	Iniciadores para la amplificación de los genes <i>typh</i> y <i>ENT</i>	26
Cuadro IV	Condiciones de termociclador para PCR multiplex para la detección de los genes <i>typh</i> y <i>ENT</i>	27
Cuadro V	Iniciadores para la amplificación de los genes <i>SipB/Ca</i> , <i>cmlA/tet</i> , <i>PSE-1</i> , <i>TEM</i>	29
Cuadro VI	Condiciones de termociclador para PCR multiplex para la detección de los genes <i>SipB/Ca</i> , <i>cmlA/tet</i> , <i>PSE-1</i> , <i>TEM</i> ..	30
Cuadro VII	Resultados de pruebas bioquímicas a cepas sugestivas a <i>Salmonella</i> spp.	31
Cuadro VIII	Resultados de antibiograma	37
Cuadro IX	Resistencia fenotípica y genotípica en <i>Salmonella</i> spp.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
Figura I	Modelo de patogénesis de <i>Salmonella</i> entérica serovar <i>Typhimurium</i>	9
Figura II	Antibiograma Kirby Bauer. Método de difusión en disco.....	21
Figura III	Bandas de un fragmento de 284 pb del gen invA.....	33
Figura IV	Bandas positivas a un fragmento de 401pb correspondientes al gen TYPH	35
Figura V	Bandas positivas a un fragmento de 232pb correspondientes al gen sipB/C.....	40
Figura VI	Bandas positivas a un fragmento de 291 pb. Correspondientes al gen TEM.....	41
Figura VII	Bandas positivas a un fragmento de 132 pb. Correspondientes al gen PSE.....	42

RESUMEN

La resistencia a antibióticos de las enterobacterias del género *Salmonella* spp. ha ido en aumento en los últimos años, tanto en humanos como en animales, dificultado así la adecuada selección de los tratamientos contra infecciones causadas por estas bacterias. En el presente estudio se determinó la resistencia antimicrobiana fenotípica-genotípica de los genes que confieren resistencia a los antibióticos cloranfenicol (cmlA/tetR), ampicilina (PSE, TEM) y sulfonamidas (SipB/C) de diferentes cepas de *Salmonella* spp. correspondientes a los serotipos enteritidis y typhimurium (*ENT* y *typh*), aisladas de caninos en Mexicali, Baja California, México. Del total de muestras analizadas (n=30), el 60% (18/30) correspondieron al serotipo *S. entérica typhimurium*, mientras que el 40% (12/30) fueron *Salmonella entérica* spp. En este estudio se obtuvo una prevalencia del 2.5% por método de PCR. El 100% (30/30) de las muestras mostraron resistencia fenotípica a ampicilina, 16.6% (5/30) a Cloranfenicol, 13.33% (4/30) a Trimetoprima – sulfametoxazol, cefepimce. 100% (30/30), a Cefotaxima 17/30 (56.60%) a Ceftriaxona 3/30 (3.33%), Cefalotina 30/30 (100%). Adicionalmente, de las 30 muestras analizadas por método de PCR para la detección de los genes de resistencia, el 100% (30/30) amplificaron un fragmento del gen SipB/C, el 6.6% (2/30) del gen cmlA/tet, asimismo, el 16.6% (5/30) y 96.6% (29/30) de las muestras resultaron positivas para los genes PSE y TEM, respectivamente. Estos resultados representan el primer reporte de genes de resistencia en bacterias del género *Salmonella* spp. en Baja California, México.

Palabras Claves: Resistencia, fenotípica, genotípica, salmonelosis, Antibióticos, PCR, Gen, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. has been increasing in recent years in both humans and animals, hindering the proper selection of treatments against infections caused by these bacteria. In the present study was determined the phenotypic-genotypic antimicrobial resistance of the genes that confer antibiotic resistance to chloramphenicol (cmlA / tetR), ampicillin (PSE, TEM) and sulfonamides (SipB / C) of different strains of *Salmonella* spp. of the enteritidis and typhimurium (ENT and typh) serotypes, isolated from canines in Mexicali, Baja California, Mexico. Of the total samples analyzed (n = 30), 60% (18/30) corresponded to the *S. enteric typhimurium* serotype, while 40% (12/30) were *Salmonella enterica* spp. In this study a prevalence of 2.5% of *Salmonella* spp. was obtained by PCR method. Likewise, 100% (30/30) of the samples showed phenotypic resistance to ampicillin, 16.6% (5/30) to Chloramphenicol, 13.33% (4/30) to Trimethoprim - sulfamethoxazole, 100% (30/30) to cefepime, 56.60% (17/30) to Cefotaxime, 3.33% (3/30) to Ceftriaxone and 100% (30/30) to Cephalothin. Additionally, of the 30 samples analyzed by PCR method for the detection of resistance genes, 100% (30/30) amplified a fragment of the SipB/C gene, 6.6% (2/30) of the cmlA/tet gene Likewise, 16.6% (5/30) and 96.6% (29/30) of the samples were positive for the PSE and TEM genes, respectively. These results represent the first report of resistance genes in bacteria of the genus *Salmonella* spp. in Baja California, Mexico.

Keywords: Resistance, phenotypic, genotypic, salmonellosis, Antibiotics, PCR, Gene, *Salmonella* spp.

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Salmonella entérica*, es un patógeno que infecta tanto a humanos como animales, y se caracteriza por producir enteritis, fiebre y septicemia. *Salmonella* spp. es una bacteria bacilo Gram negativa, no esporulada, anaeróbica facultativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, ureasa negativa que posee flagelos para su movilidad. El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual presenta dos especies, *S. entérica* y *S. bongori*, para las cuales se han descrito más de 2500 serovariedades, entre ellas *Salmonella typhi*, *S. enteritidis* y *S. typhimurium*. La principal vía de infección es oral, mediante la ingesta de leche sin pasteurizar, así como de agua y alimento contaminados con la bacteria. Las manifestaciones de los signos clínicos pueden presentarse de uno a tres días posteriores a la infección, se caracterizan por la presencia de vómito, diarrea, fiebre y sudoración, principalmente (Kit et al., 2011). Se ha reportado una mayor incidencia de las infecciones por *Salmonella* spp. durante las estaciones de verano y otoño, llegando a registrarse más de 50.000 casos de *S. no tifoidea* en el año 2010, asimismo se estiman 21 millones de infecciones y 200,000 muertes por *Salmonella typhi* a nivel mundial (Murray et al 2013).

En los últimos años se ha visto un incremento en la resistencia a antibióticos por parte de numerosos patógenos. En lo que a *Salmonella* spp. respecta, la resistencia a los antibióticos ha ido también en aumento en las últimas décadas, convirtiéndose en una amenaza potencial para la salud pública y de los animales. Según la CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) los casos de resistencia a los antibióticos en *Salmonella* spp. han ido en aumento en todo el mundo y no solo en países en vías de desarrollo, llegando a duplicarse en la última década. La resistencia antimicrobiana se define como el proceso por el cual una bacteria bloquea o disminuye la acción de un fármaco (Arias et al., 2004); entre los factores que ocasionan dicha resistencia se encuentran el uso indiscriminado de antibióticos, ya sea con fines metafilácticos, los cuales generalmente son utilizados sin prescripción médica;

el uso incorrecto de los antibióticos, ya sea por la interrupción o por cambios en los periodos de los tratamientos, así como la incorrecta aplicación de las dosis. Otro de los factores es la transferencia de plásmidos entre bacterias resistentes a bacterias susceptibles; tanto plásmidos como transposones e integrones, son elementos genéticos que tienen el potencial de conferir mecanismos de resistencia, por lo que representan un riesgo potencial en el desarrollo de la resistencia a antibióticos.

Dentro de las técnicas para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico se encuentra el método de Kirby Bauer. La técnica se desarrolla de manera in vitro agregando de 3 a 5 colonias de bacterias, sobre las cuales se colocan sensidiscos con los antibióticos de interés. Durante este proceso el antibiótico se difunde en el agar, inhibiendo el crecimiento de la bacteria, por lo que se mostrará una zona de inhibición, dependiendo del tamaño de dicha zona (medida en milímetros) será la sensibilidad que presenta la bacteria hacia el fármaco. Un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm representa que la cepa es sensible al antibiótico, por otro lado, cuando los diámetros son de 15 mm o menos, la cepa se considera resistente de acuerdo a Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) (Stephen I et al., 2005). Estudios anteriores han registrado que la ampicilina, tetraciclina y carbenicilina han sido los antibióticos para los que se presenta mayor resistencia en aislados de *Salmonella spp.* (Rodríguez et al., 2007; Puig et al., 2008). Por otro lado, Farías (2009) reportó una resistencia del 17 al 43% a ampicilina y del 10 al 46% a cotrimoxazol en cepas de *Salmonella spp.* Aisladas de alimentos. Asimismo, INAFOSN (2015) reporta que Cloranfenicol, Penicilinas y Trimetoprima/Sulfametozal fueron los primeros antibióticos para lo que las bacterias desarrollaron resistencia, y esta fue propagada por la captación de nuevo material genético transferible. En los últimos años se han realizado estudios moleculares para la detección de genes de resistencia, siendo los genes TEM y PSE los que confieren resistencia microbiana a Ampicilinas, CmlA/tet a Cloranfenicol y SipB/C a Sulfonamida (Talavera et al., 2011).

El incremento a la resistencia de fármacos se ha convertido en un problema de salud sanitario de suma importancia, principalmente cuando se habla de patógenos con propiedades zoonóticas como lo es *Salmonella* spp. En los últimos años se han realizado estudios en diferentes especies, (cerdos y aves) y en alimento para la detección de resistencia antimicrobiana de dicha bacteria. Sin embargo, falta actualizar el conocimiento respecto a las diferentes cepas que afectan a otras especies, entre ellas los animales de compañía como perros y gatos, ya que generalmente existe una estrecha relación mascota-propietario, llegando a ser una importante fuente de infección para los humanos. En Baja California son pocos los datos reportados respecto a la presencia de *Salmonella* spp., en 2015, Núñez et al. reportaron una prevalencia de *Salmonella* spp. del 6.75% en perros del Centro Municipal de Control Animal en el municipio de Mexicali. Asimismo, Rentería (2018) reportó una prevalencia de *Salmonella* spp. del 7.65% en caninos atendidos en clínicas veterinarias, también en la ciudad de Mexicali. A pesar de tener datos respecto a la prevalencia de *Salmonella* spp. en las poblaciones de caninos en B.C., no se han realizado estudios que reporten las diferentes cepas de *Salmonella* spp. Que afectan a perros, así como los niveles de resistencia que presentan hacia los diferentes fármacos utilizados en clínicas veterinarias de la región. Por lo tanto, es importante desarrollar un estudio que genere un panorama de la situación actual respecto a este importante patógeno entérico, para así determinar las medidas de control y prevención de la enfermedad, así como los niveles de resistencia a fármacos que presentan, para promover un buen control y uso de los fármacos. Por lo anterior

Los objetivos del presente estudio fueron i) Aislar bacterias del genero *Salmonella* spp. De perros del Centro de Control Animal (CCA) en el municipio de Mexicali, Baja California, México, ii) Determinar la serovariedad de los aislados de *Salmonella* utilizando la técnica de PCR, iii) Detectar la resistencia a

diferentes familias de antibióticos de las serovariedades de *Salmonella spp.* aisladas por medio de la técnica de Kirby Bauer, iv) Determinar la presencia de los genes de resistencia de cepas de *Salmonella spp.* a antibióticos por medio de PCR.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes

Daniel Elmer Salomon y Theobald Smith fueron quienes aislaron *Salmonella choleraesuis* en muestras de un cerdo que presentaba peste porcina clásica, asimismo, en el año 1900 el bacteriólogo francés Joseph Lean Mercel Lignieres sugirió llamar a la bacteria *Salmonella* en honor a Salomon. La clasificación de la enterobacteria se realizó de acuerdo a la combinación de antígenos de superficie somáticos o antígeno O y flagelar o antígeno H y el antígeno capsular Vi. White en 1926 propuso dicha clasificación y para el año de 1941 Kauffmann lo modificó llamándolo esquema Kauffmann-White. Las primeras cepas de *Salmonella* spp. resistentes se detectaron en el año de 1950. Hasta la década de 1980 la *Salmonella* no tifoidea era considerada sensible a antibióticos, sin embargo, fue en la década de 1990 cuando se reportó que la resistencia antimicrobiana fue aumentando de manera considerable (Feliz, 2011). A comienzos del siglo XX las infecciones reportadas por *Salmonella* eran causadas principalmente por las cepas de *Salmonella entérica* serovariedad typhi, sin embargo, en el año de 1994 emergió *S. entérica* serovariedad enteritidis, la cual se asoció a las industrias avícolas (Belén, 2015)

Epidemiología

Salmonella es una bacteria que puede estar presente en casi todos los animales, tanto en mamíferos como en anfibios, reptiles e insectos. Se ha reportado que aproximadamente el 1 al 3 % de los animales domésticos presentan *Salmonella*, mientras que en reptiles se presenta en un 36%, asimismo se ha aislado del 1 al 36 % en perros sanos y de 1 a 18 % en gatos sanos, por otro lado, se ha reportado un 6% de prevalencia de *Salmonella* spp. en ganado vacuno.

Respecto a las serovariedades, algunas como *Salmonella typhi* y *paratyphi* producen infecciones en humanos y no en otros animales, contrariamente *S. choleraesuis* se presenta más en animales, pero cuando los humanos adquieren una infección con dicha serovariedad suelen presentarse casos graves. En la mayoría de los casos, la infección por *Salmonella* spp. es producida por la ingesta de material contaminado o por vía directa fecal-oral, presentándose una mayor incidencia en las estaciones de verano y otoño, en donde han llegado a registrarse más de 50.000 casos de *S. no tifoidea* en el año 2010, asimismo, se estima que a nivel mundial se presentan 21 millones de infecciones y 200,000 muertes por *Salmonella typhi* (Murray et al., 2013). Adicionalmente se ha reportado que las infecciones por *Salmonella* spp. son más comunes en animales jóvenes que se encuentran en periodo de lactancia, o al pasar por un momento estresante en septicemia pudiendo llegar a presentarse un 100% de mortalidad. (Center for food security and public health, 2005).

Aproximadamente 40,000 casos de salmonelosis han sido reportados anualmente en Estados Unidos, presentándose una mayor incidencia en niños y ancianos. En Asia y África, se han reportado más de 27 millones de casos de salmonelosis anualmente, con un promedio de 217,000 muertes (Jong et al., 2012; Fábrega et al., 2013)

Ahmed.M.A et al (2007). Determino prevalencia de *salmonella* spp en 1.3% en animales de zoológico en Japón. (Fongra et al 2009) realizo un

estudio de prevalencia en perros del centro de bienestar animal la perla Medellín Colombia por medio de PCR donde no detecto *salmonella spp.*

Tsai. H.J et al. (2007) realizo estudio se *salmonella spp* y *campiobacter spp*, en perros domésticos y perros callejeros donde en los perros domésticos fueron positivos el 2.1% y de los perros callejeros 16.7 y 6.3%/Mohamed. A.E.T et al (2017) realizo un estudio de prevalencia, serotipificacion, en Arabia saudita donde *S. typhimurium* fue de 15.2%, *enteritidis* 39.4, realizo susceptibilidad antimicrobiana en la cual eritromicina fue resistente en un 100%, cefalotina cefuroxime y cefuroximeaxetil 99.9%, cefoxitina 87.9%, Gentamicina 90.9%, amikacina 87.9, nitrofuranteina 27.3%, trimetoprima- sulfametoxazol 15.2 y penicilinas 3%.

Leonard E.K. et el (2011) realizo un estudio en perros donde obtuvo el 23% de prevalencia de *salmonella spp.* Y el 13% de susceptibilidad antimicrobiana a ampicilina, cefoxitina, cetiofur y ceftriaxona. Kiflu. B. et al. (2017) obtuvo una prevalencia del 11.7% donde se detectaron 14 serotipos los predominantes fueron *S. Bronx* 16.7%. *S. Newport* 14.3% y *S. typhimurium* 9.5%. se encontraron tasas de resistencia más altas para oxitetraciclina 59.5%, neomicina 50%, estreptomocina 38.1%, cefalotina 33.3%, doxiciclina 30.9% ampicilina 30.9% y amoxicilina/A clavulanico 26.2%. Talavera R.M. et al (2011)) realizo estudio de resistencia antibiótica de genotipos de cepas en cerdos sacrificado en el rastro del estado de México. El 2.29% presento el Fagotipo DT104. El 57.47% mostraron resistencia al CmlA/Tet, el 2.29% a gen PSE, y el 20.68% al gen TEM.

Sangsak. S. et al (2017). Realizo estudio de resistencia antimicrobiana fenotípica- genotípica en perros y gatos donde en encontró el 13.9% fueron *S. typhimurium* en el antibiograma 43% fueron multidroga resistente entre los fármacos que están fueron sulfametoxazol 100%, ampicilina 50%, tetraciclina 32.1%, ceftriaxona 2.5% y ciprofloxacino 0.8%. En cuanto a genes de resistencia el gen PSE amplifico el 3.2% el gen TEM 40%y el gen CmlA 60.7%.

Etiología

La salmonelosis es una infección causada por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, género *Salmonella* spp. Son patógenos intracelulares primarios que no pertenecen a la microbiota normal presente en el tracto digestivo. *Salmonella* spp. es una bacteria bacilo Gram negativa, no esporuladas anaerobia facultativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, ureasa negativa que no fermenta la lactosa ni la sacarosa, además la mayor parte de las cepas son móviles, ya que poseen flagelos peritricosos (López, 2004; Kit et al., 2011). Presentan un diámetro de 0,7 a 1,5 μm aproximadamente, con una longitud de 2 a 5 μm . Logran sobrevivir largos periodos en el medio ambiente a temperaturas que van desde los 7 a 47 $^{\circ}\text{C}$, inactivándose a pH inferiores a 5, siendo el pH óptimo entre 6.5 a 7.5. *Salmonella* spp. presenta una capa de lipopolisacáridos (LPS) en su pared celular, en donde se localizan los antígenos somáticos, los cuales se clasifican en mayores, que son compartidos por todas las salmonellas, así como los antígenos somáticos menores, los cuales son compartidos por salmonellas de diferentes serovariedades (A B y D). los antígenos flagelares son termolábiles y están compuestos por la proteína flagelina. La mayor parte de las cepas expresan dos flagelinas, la fase 1 o específica y la fase 2, que es no específica, el antígeno Vi se encuentra presente en serovariedades como *dublín* y *typhi* (Feliz, 2011; Pedraza et al., 2014).

Los estudios de hibridación de DNA han demostrado que existen siete grupos evolutivos, los cuales se dividen en 2 especies: *Salmonella entérica* y *S. bongori*, *S. entérica* posee 5 sub especies, *S. entérica salamae*, *arizone*, *diarizone*, *hautenae* y *S. enterica indica*. La más común es *S. entérica sub entérica serotipo typhimurium*. Adicionalmente, se han reportado más de 2500 serovariedades, de ellas 1400 han sido incluidos en el grupo 1 de *S. entérica*, siendo los de mayor importancia *S. paratyphi A* y *B*, así como *S. cholerasuis* y *S. typhi* (Fábrega et al., 2010; Geo et al., 2011).

Epidemiológicamente, *Salmonella* spp. se pueden clasificar en 3 grupos, aquellos que infectan a humanos, que son *S. typhi* y *paratyphi*, los cuales no infectan a animales domésticos ni silvestres. Las variedades que infectan a animales son *S. pullorium* y *gallinarum*, *dublin*, *abortus* y *choleraesuis*, aunque algunas de ellas pueden llegar a infectar a humanos, como son *dublin* y *choleraesuis*. El tercer grupo son aquellas que no poseen una adaptación a una especie concreta, es decir, que presenta características zoonóticas, como son *S. nevor*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. (López, 2004).

Patogenia

La mayor parte de las salmonellas son patógenas de los animales, los cuales representan un reservorio para infecciones en humanos. La entrada principal es por vía oral, debido a la contaminación directa con heces, o bien, por la contaminación de alimentos y bebidas. El hospedador es un factor primordial para adquirir la enfermedad, dentro de los factores que influyen en la adquisición de la infección se encuentran la acidez estomacal, la microbiota intestinal y la inmunidad intestinal (Geo et al., 2011). Se ha reportado que la dosis infectante es de 10^5 a 10^8 .

Una vez que se produce la ingesta de *Salmonella*, esta tiene que atravesar el estómago, para protegerse de los ácidos gástricos la bacteria activa una respuesta de tolerancia al ácido (ATR), para mantener un pH intracelular superior a los del medio extracelular. Una vez ha llegado *Salmonella* al intestino delgado, las bacterias se unen a la mucosa e invaden a las células M. Posteriormente, se quedan dentro de vacuolas, las cuales son el único compartimento intracelular en el que *Salmonella* sobrevive, y es ahí donde se replica. Esto se debe tanto a la regulación del anclaje y al englobamiento. La replicación se debe también a dos genes, los islotes de patogenicidad tipo 1 y 2. El islote tipo 1 codifica proteínas Ssps que son proteínas invasivas y el sistema de secreción tipo 3, el cual inyecta proteínas al interior de las células, lo que provoca un cambio de conformación en el citoesqueleto provocando la formación de vacuolas dentro de la célula diana, adicionalmente, los islotes de

patogenicidad tipo II les permite invadir el sistema inmunitario (Murray et al., 2013).

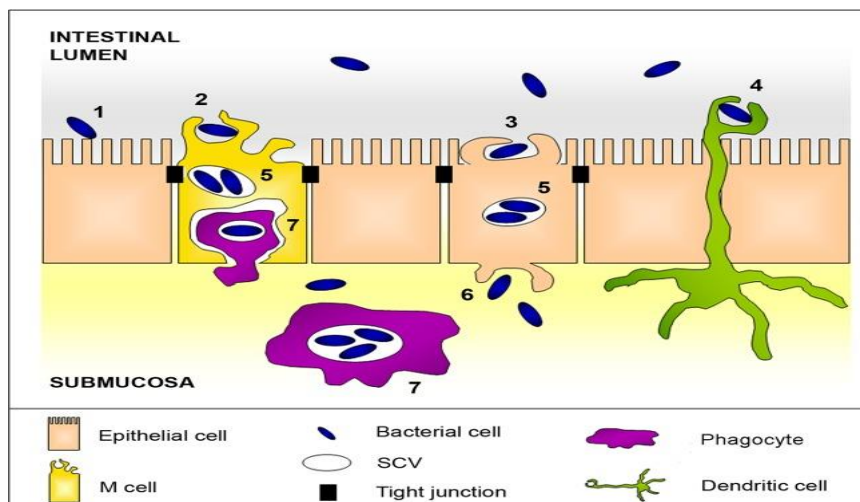


Figura I. Modelo de patogénesis de *Salmonella entérica serovar Typhimurium* (Frobige et al., 2009).

Factores de virulencia

El 90% de los genes de las serovariedades *S. typhi* y *S. typhimurium* son idénticos, el 10% restante es donde se encuentran los factores de virulencia codificados principalmente en las islas de patogenicidad SPI y otros en el plásmido de virulencia salmonella (pSTV). Se han descrito más de 20 islas de patogenicidad siendo SPI-1 y SPI-2 los más estudiados. SPI-1 codifica varias proteínas efectoras que principalmente desencadenan la invasión de células epiteliales mediante la mediación de reordenamientos citoesqueléticos de actina y, por tanto, la internalización de las bacterias. Estos efectores son trasladados a la célula huésped por medio de un sistema de secreción de tipo III (T3SS), denominado T3SS-1, también codificado dentro de SPI-1.

Los operones *prg/org* e *inv/spa* codifican el complejo de agujas per se, mientras que los operones *sic/sip* codifican las proteínas efectoras y el translocón (SipBCD), una estructura formadora de poros que se incrusta en la membrana de la célula huésped y entrega estos efectores al citosol

huésped. Sin embargo, se ha informado que otros efectores inyectados están codificados en otra parte del cromosoma. Además, varios chaperones también están codificados dentro de SPI-1. A través de la unión específica a sus dianas (proteínas secretadas o efectoras), estas chaperonas protegen las proteínas relacionadas con SPI-1 de la degradación, previenen las interacciones prematuras o median su reconocimiento por T3SS-1. Que a su vez el T3SS y sus proteínas codificadas en SPI-2 son necesarias para la supervivencia intracelular en los macrófagos y su replicación dentro del macrófago, lo que provoca una enfermedad sistémica. Dentro de los fagocitos, T3SS-2 impide el tráfico de la NADPH oxidasa hacia el SCV, evitando una ráfaga fagocítica. (Fábrega 2010; Jong et al 2012; Wiesner et al 2016).

Plásmidos y profagos

Los fagos o plásmidos son moléculas de ADN que las bacterias poseen, estas estructuras tienen la capacidad de intercambiar genes entre bacterias de manera horizontal, pudiendo aumentar la virulencia, o generar resistencia a los antibióticos. Algunas salmonellas poseen un plásmido de virulencia (pSLT) que alberga los genes *spv*. Dicho plásmido actúa como una toxina ADP ribosilante intracelular que provoca citotoxicidad en el hospedador, el cual además es necesario para la supervivencia intra-macrófagos. pSLT se encuentra ausente en *S. typhi* y *S. paratyphi*. El plásmido quimérico PR (sT98) presenta genes involucrados en la resistencia a los fármacos y la inducción de la apoptosis dentro de los macrófagos. Unos de los plásmidos que llevan genes de resistencia antimicrobiana, *cat*, *dhfr7*, *dhfr14* sul I y *bla* TEM-1 capaces de intercambiar R- plásmidos con *E. coli* y otras bacterias entéricas (Jong 2012).

Fimbrias y flagelos

Se encuentran en la superficie bacteriana, necesarios para la formación de biofilm, colonización, y fijación inicial a las células del hospedador. Cada serovariedad de *Salmonella* spp. presenta una combinación única de operones fimbriales. Adicionalmente, los flagelos le permiten a la bacteria moverse y

viajar a la barrera epitelial después de la ingestión por parte de hospedador (Jong et al., 2012).

Diagnóstico clínico

Métodos Bacteriológicos

Pre enriquecimiento no selectivo: El objetivo de esta etapa es normalizar metabólicamente las células de *Salmonella* spp., es decir, que se encuentren en determinada matriz para su perfecto desarrollo. El pre enriquecimiento no selectivo es utilizado en muestras donde puede haber un número bajo de bacterias, por lo que el objetivo es aumentar la viabilidad de las bacterias antes de transferirlas a un medio selectivo, para esto es utilizando un caldo de pre-enriquecimiento universal (UPB), el medio M9, o agua de peptona (BPW). El periodo de incubación es de 18 y 24 horas a 35 a 37 °C (Feliz, 2011).

El cultivo de enriquecimiento tiene como objetivo inhibir el crecimiento de las bacterias competidoras para favorecer el crecimiento de *Salmonella* spp. Para esto, la muestra se coloca en caldo de selenita F, Tetratinato o Rappaport. La temperatura de incubación es entre 41 y 42 °C, ya que las salmonellas tienen una elevada termo resistencia lo cual permite su multiplicación, es importante no superar los 43 °C tiempo de incubación y las 24 horas. (Feliz, 2011; Geo et al., 2011).

El cultivo en medio selectivo se basa en la presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento de otras bacterias que no sean las de interés. En el caso de *Salmonella* spp. se utilizan placas de agar Salmonella-Shigella (SS), agar entérico Hekton o agar XLD, los cuales favorecen la multiplicación de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. más que de otras entero bacterias. En dichos medios selectivos las colonias de *Salmonella* spp. tienen un aspecto característico, debido a la producción de SH₂ y su capacidad de fermentar lactosa. La temperatura de incubación es de 35 a 37 °C durante 18 a 24 horas,

posteriormente se selecciona las colonias de bacterias sospechosas en base al medio de cultivo utilizado (Feliz, 2011; Geo et al., 2011).

Para la identificación de colonias sospechosas en medios de cultivo sólidos se utilizan técnicas de reacciones bioquímicas y pruebas serológicas, las cuales permiten confirmar si las colonias seleccionadas pertenecen al género *Salmonella*. En esta etapa se diferencian las bacterias por su actividad metabólica. La identificación o confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella*, se lleva a cabo en dos medios diferenciales usados simultáneamente, que son el agar triple azúcar hierro (TSI) y el agar Lisina hierro (LIA), además se realizan pruebas bioquímicas complementarias como urea, fermentación del dulcitol, crecimiento en caldo KCN, utilización del malonato de sodio y producción del indol. Para la confirmación bioquímica se recogen de 3 a 5 colonias sospechosas del medio sólido y se inoculan en agar Triple Iron Sugar (TSI).

Métodos serológicos

La prueba de aglutinación es una técnica útil para la rápida identificación de los serogrupos de las *Salmonella spp.* Mediante antígenos. En esta técnica los sueros y el cultivo se mezclan en un portaobjeto.

Prueba de aglutinación con dilución en tubo (prueba de widal) detecta anticuerpos contra antígenos o y H (Geo et al 2011).

Métodos inmunológicos

La prueba de ELISA es la más utilizada para la detección de anticuerpos anti *Salmonella spp.*, esta técnica se basa en el uso de antígenos somáticos como LPS-ELISA, así pues, se genera una respuesta inmunitaria específica para cada antígeno, permitiendo identificar animales infectados por los diferentes serotipos de *Salmonella spp.* Los aislamientos de *Salmonella spp.* son clasificados según el esquema de Kauffmann-White (K-W), así un serotipo de *Salmonella spp.* es determinado sobre la base de la variabilidad antigénica del lipopolisacaridos, llamado antígeno O, la proteína flagelar H y el polisacárido Vi.

Métodos moleculares

Las técnicas de detección de ácidos nucleicos, permiten detectar el ADN o RNA específicos. Las pruebas más utilizadas son la hibridación y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

PCR

Es un procedimiento para la amplificación in vitro de segmentos específicos de ADN. Esta prueba es altamente sensible y se basa en la obtención de múltiples copias de una región específica del gen de interés por la acción de una polimerasa. La técnica consta de la repetición de varios ciclos sucesivos, donde se provoca la desnaturalización del ácido nucleico, posteriormente se alinean los cebadores en la región de interés, y se comienza la creación de un nuevo fragmento de ADN por acción de la proteína polimerasa, resultando en la síntesis de una nueva copia de la región específica. Cuando se realiza un PCR múltiple se pretende amplificar simultáneamente en un tubo varias secuencias específicas, lo que requiere que los reactivos mezclados sean suficiente para que permita la detección de cada región diana (López, 2004).

Resistencia a agentes antimicrobianos

La resistencia a antimicrobianos es un problema que ha ido en aumento en los últimos años, resultando en una terapéutica médica deficiente ya que los tratamientos no son efectivos y no hay una mejoría del paciente. Las bacterias son eficientes en aumentar los efectos de resistencia, debido a su capacidad de transferir genes en forma horizontal, como resultado, las infecciones suelen ser más severas, aumento el número de pacientes muertos. Una bacteria es sensible cuando el antimicrobiano es capaz de inhibir su crecimiento y replicación, contrariamente, se consideran resistentes cuando dicho medicamento no es suficiente para inhibir la multiplicación o matar a la bacteria (La Pierre et al., 2010).

Existe la resistencia natural, propiedad innata de ciertos organismos por la ausencia del sitio diana o mecanismos de restricción de baja expresión. Y la

resistencia adquirida que ha sido a causa del tiempo y uso de los antimicrobianos, como son secuencia de mutaciones en el cromosoma bacteriano o nuevo material genético (Feliz, 2011). Dentro de los factores que han contribuido al aumento en la resistencia microbiana adquirida se encuentran el uso de antibióticos en la producción de animales para consumo humano, usándolos como promotores del crecimiento y con fines metafilácticos. Asimismo, las bacterias tienen la capacidad de transferir genes de una bacteria a otra, proceso denominado transferencia horizontal. Los plásmidos, transposones e integrones son los elementos que intercambian el material genético provocando que las bacterias se vuelvan resistentes, este intercambio genético puede llevarse a cabo por los procesos de conjugación, transformación o traducción, adicionalmente, estas estructuras poseen enzimas que inactivan a los fármacos, expresión de bombas de flujo y porinas (Feliz, 2011; Belén, 2015)

Existen 3 mecanismos por el cual las bacterias llegan a ser resistentes, una de ellas es la modificación del antimicrobiano; se han descrito más de 80 B-lactamasas, siendo TEM y PSE las más importantes, otro mecanismo es la disminución de la concentración intracelular del antimicrobiano por una menor permeabilidad de la membrana externa o el mecanismo de flujo activo, cambios en el sitio diana en el cual la célula bacteriana hace que el antibiótico no lo reconozca o no pueda actuar adecuadamente estos mecanismos pueden ser transmitidos de una bacteria a otra.

Transmisión de genes de resistencia

La diseminación de los genes de resistencia se debe a la transferencia horizontal de genes, principalmente. Los elementos que se encargan de la transferencia de dichos genes son los plásmidos, transposones e integrones. Los transposones son secuencias de inserción pequeñas (entre 760 y 2,500 pb). Consta de dos repeticiones cortas e invertidas a cada extremo y una o diversas pautas abiertas de lectura, que codifica la transposasa. Los transposones tienen la capacidad de moverse dentro del genoma bacteriano, ya sea por recombinación no homologa, en la cual pueden saltar de un lugar a otro

del cromosoma o del plásmido. Dependen de la replicación de su hospedador. Los integrones son capaces de captar genes que codifican determinantes de resistencia antimicrobiana, la integración se produce por un mecanismo de integración sitio específico. Los integrones están formados por 3 elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos, uno que codifica para una integrasa (intl), el otro es el lugar de recombinación sitio específico (attI) y por un promotor (pont) para la expresión de los genes cassettes integrados. Se conocen nueve clases los de clase 1,2 y 3 contienen genes cassette de resistencia a los antibióticos y el 9 contiene una secuencia 3' conservada que contiene un gen resistente a sulfonamida (sull) (Ortega 2008). Estos 3 elementos se transmiten de manera vertical durante la división de las bacterias, pudiendo ocurrir también de manera horizontal de una bacteria a otra a través de los procesos de transducción, transformación y conjugación. (Feliz, 2011). Durante la transducción se adquiere el material genético por un medio de un bacteriófago, en dicho proceso la bacteria adquiere una cantidad pequeña de ADN. La transformación es la adquisición de ADN directamente del medio ambiente a partir de otra bacteria que liberó su material genético, este material se recombina con el cromosoma de la bacteria receptora en aquellas regiones donde hay suficiente homología y da lugar a genes funcionales. Por otro lado, en el proceso de conjugación se da una transferencia de genes entre dos células que están en contacto debido a estructuras genéticas que poseen los microorganismos denominados plásmidos. Los plásmidos son moléculas circulares de ADN doble que no codifican funciones esenciales para las células, pero que se replican autónomamente independientemente al cromosoma de la célula, son flexibles y se difunden entre diversas especie y géneros de bacterias por difusión horizontal, dichas estructuras poseen la capacidad de intercambiar material genético adquiriendo una variedad de genes, pudiendo transferirse así a otros plásmidos en la bacteria o integrarse al cromosoma.

Pruebas de resistencia a antibióticos

Uno de los métodos más utilizados para el análisis de la resistencia a antibióticos es el Método de Kirby Bauer, esta técnica se utiliza para la determinación de la CMI, capaz de inhibir la multiplicación bacteriana. En esta prueba se emplean placas que contienen diferentes concentraciones de antibióticos inoculados con suspensión bacteriana, y se examina si existe o no crecimiento, para resultados efectivos el pH del agar debe encontrarse entre 7.2 y 7.4 a temperatura ambiente (Feliz, 2011).

En un estudio de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. se realizó la prueba de Kirby Bauer para 12 antibióticos a 63 cepas aisladas de alimentos procedentes de provincias de Cuba y se encontró resistencia a ampicilina (19.0%), tetraciclina (12.7%) y carbenicilina (11.1%) (Puig et al., 2008). En otro estudio de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. de origen clínico y alimentario se analizaron por el método de difusión de Kirby Bauer un total de 102 cepas, 30 aisladas de pacientes y 72 de alimentos. Para esto se analizaron 14 antibióticos, donde se reportó resistencia a ampicilina en el 12.7% de las muestras, 9% a y 10.8% a tetraciclina (Puig et al., 2007). Por otro lado, en un estudio realizado por Wiesner et al., (2016) se reportó la caracterización de una cepa aislada de un hemocultivo tomado de una mujer que sufrió de Salmonelosis refractaria a la terapia convencional con cefalosporina de espectro extendido. La cepa, denominada 33676, se caracterizó como serogrupo A de *Salmonella* multirresistente, perteneció al genotipo Typhimurium ST213. Los análisis de PCR revelaron la presencia de IncA /C, IncFIIA y plásmidos de tipo ColE1 y la Ausencia del plásmido de virulencia de *Salmonella* (pSTV). Los ensayos de conjugación mostraron que el gen de resistencia ESC BlaCMY-2 se llevó en el plásmido conjugativo IncF, en lugar del plásmido IncA /C. En otro estudio de susceptibilidad antimicrobiana se obtuvieron un total de 68 aislados de *Salmonella entérica* provenientes de bovinos, equinos, cerdos, gaviotas y alimentos, fueron también identificadas 9 serovariedades de *Salmonella*. De total de cepas

aisladas el 69,1% presentó resistencia a oxitetraciclina (Junod et al., 2013). Asimismo, en un estudio en donde se reportaron 59 pacientes con *Salmonella entérica* no typhi el 15,8% y el 21,0% de los aislamientos presentaron resistencia a cefalosporinas de 3ª generación y a ampicilina, respectivamente (Rodríguez et al., 2007).

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la ciudad de Mexicali, Baja California, México. El muestro se realizó en el Centro de Control Animal, mientras que los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología y el Laboratorio de Biología molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Tipo de estudio

Se realizó un estudio epidemiológico observacional de tipo transversal por conveniencia.

Recolección de muestra

Se realizó un muestreo por conveniencia durante el periodo de agosto a noviembre de 2018. El muestro se realizó en el Centro Municipal de Control Animal el cual se visitó los días lunes a las 6 a.m. para recolectar 40 muestras de heces de perros utilizando el método de hisopado rectal.

Una vez que las muestras fueron recolectadas fueron trasladadas y refrigeradas de 2 a 8 °C en el laboratorio de Microbiología del IICV para su posterior análisis.

Análisis de laboratorio

Pre-enriquecimiento

Se inocularon las muestras de heces previamente recolectadas en un tubo falcón con caldo agua peptonada (BD®), posteriormente fueron incubadas durante 24 horas a 33 °C (Feliz et al., 2011).

Enriquecimiento

De las muestras previamente inoculadas en agua peptonada se tomó 1 ml y se colocó en selenita, posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Medio selectivo

Las muestras en selenite se inocularon en medio selectivo Hektoen Entérico Agar (HEA), para esto se utilizó un asa estéril y se incubó a 37°C durante 24 horas. Una vez que se observó el crecimiento de las colonias verdes - azul verdoso con un centro negro se purificaron en un nuevo medio (HEA).

Pruebas bioquímicas

Una vez que se identificaron las colonias sospechosas a *Salmonella* spp. se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Triple Sugar Iron (BD®), medio citrato Simmons (BD®), sulfuro-indol-manitol (Acumedia®), Urea (BD®), agar hierro lisina (BD®), Rojo de Metilo (BD®), Voges Proskauer (BD®), oxidasa y catalasa. Las muestras sospechosas se almacenaron en medio Todd Hewitt en microtubos de 1.5 ml con glicerol al 70%, a una temperatura de -20 °C.

Adicionalmente se analizaron 25 muestras de *Salmonella* spp. aisladas previamente en el Laboratorio de biología molecular del IICV por la M.C. Karla Michelle Núñez Castro, dichas muestras fueron igualmente obtenidas de heces de perros del Centro Municipal de Control Animal de la ciudad de Mexicali. Las alícuotas fueron congeladas en medio Todd Hewitt con glicerol al 10%.

Kirby Bauer método de difusión en disco

Preparación del agar Müller Hinton

Se suspendieron 37g de medio Müller Hinton deshidratado en un litro de agua destilada. Se calentó con agitación frecuentemente y se hirvió durante 1 minuto. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, se enfrió a 45-50 °C, y se realizaron pruebas de esterilidad. Posteriormente se utilizó la técnica de difusión en disco Kirby-Bauer para determinar la sensibilidad a antibióticos de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas. Todos los métodos se realizaron conforme a las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; Comité Europeo de Antibiogramas).

Preparación del inóculo

Se realizó el método directo a partir de colonias de *Salmonella* spp. aisladas de una placa de cultivo con agar no selectivo, se preparó una suspensión en caldo Müller-Hinton posteriormente se ajustó a la escala .5 de Mc Farland en suero fisiológico. Se agitó en un agitador vortex durante 15-20 segundos.

Inoculación de las placas

Una vez que transcurrieron 15 minutos de haber ajustado el inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, después se rotó el hisopo contra la pared del tubo varias veces por encima del líquido para remover el exceso del inóculo. Posteriormente se inocularon las placas de Müller Hilton deslizando el hisopo en la superficie de la placa 3 veces para conseguir una siembra uniforme, se dejó secar la placa durante 3 a 5 minutos antes de la aplicación de los discos.

Aplicación de los discos

Se colocaron los sensidiscos para bacterias Gram negativas (Bio-Rad®). Cada sensidisco contenía los siguientes antibióticos: Amikacina (AK) 30µg, ampicilina (AM) 10µg, cefalotina (CF) 30µg, cefepime (FEP) 30µg, cefotaxima (CTX) 30µg, ceftriaxona (CRO) 30µg, cloranfenicol (CL) 30µg, gentamicina (GE) 10µg, levofloxacin (LEV) 5µg, netilmicina (NET) 30µg, nitrofurantoina (NF) 300µg y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) 25µg. El sensidisco se colocó sobre la superficie del agar utilizando una pinza estéril, presionando suavemente para asegurar el contacto con la superficie del agar, se distribuyó los discos a una distancia de 25 mm, en una placa de 150 mm y se colocaron los 12 discos (Figura II).

Incubación

Se incubaron las placas invertidas quedando el agar arriba en oxígeno a 36 °C.

Lectura del disco

La lectura se realizó posterior a las 18 horas de la aplicación de los sensidiscos. Utilizando una regla y sobre un fondo negro se midieron los diámetros de las zonas de inhibición para cada antibiótico, siendo el punto final el área que no mostro crecimiento. Los diámetros de inhibición fueron interpretados conforme a las especificaciones Bio-Rad® para Gram negativos siendo catalogadas como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R). Un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm representó una cepa sensible, mientras que diámetros de 15 mm o menos fueron interpretados como cepas resistentes de acuerdo a (CLSI, 2014).



Figura II. Antibiograma Kirby Bauer. Método de difusión en disco.

Identificación molecular de *Salmonella* spp. y de los genes de resistencia antimicrobiana

Extracción del ADN bacteriano

Se utilizó el kit DNeasy blood and tissue de Qiagen (Valencia, CA) siguiendo el protocolo para la extracción de ADN de bacterias Gram negativas.

Detección del gen invA de Salmonella spp.

Para la reacción de PCR se añadieron 5 µl Taq DNA Pol Buffer 5x (Promega, Madison, Wi EU), 1.6 µl de 25mM MgCl₂, 0.5 µl de 200 mM de dNTPs, 5 µl de cada iniciador (Cuadro I), 0.3 µl de Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, Wi, EU), 3 µl de ADN bacteriano y 12.6 µl de H₂O grado molecular, con un volumen final de 25 µl por reacción. Como control positivo se utilizaron las cepas 375 y ATCC, mientras que como control negativo se utilizó agua grado molecular.

El PCR se llevó cabo en un termociclador de la marca ThermoHybaid™ (EU). Las condiciones del PCR se encuentran resumidas en el Cuadro II. Finalmente se utilizaron 10µl de cada producto de PCR para realizar electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.5 µg/ml de Bromuro de Etidio durante 1.5 horas a 100 voltios. Los geles se observaron y fotodocumentaron en un transiluminador de luz ultravioleta UVP™ (EU).

Cuadro I. Iniciadores para la amplificación del gen *invA*

<i>Iniciadores</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Pares de base</i>
<i>InvA F 139</i>	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA-3'	284
<i>InvA R141</i>	5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC -3'	

Cuadro II. Condiciones de termociclador para detección de gen invA

Descripción	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 mins.	1
Desnaturalización	94°C	60 seg.	35
Alineamiento	64°C	30 seg.	
Extensión	72°C	30 seg.	
Extensión final	72°C	7 mins	1

Tipificación de Salmonella utilizando PCR Multiplex

Se utilizó PCR multiplex para la tipificación de *Salmonella*, los iniciadores utilizados se describen en el cuadro III.

Para la reacción de PCR se añadieron 2 µl Taq DNA Pol Buffer 5x (Promega, Madison, Wi EU), 1.5 µl de 25mM MgCl₂, 0.5 µl de 200 mM de dNTPs, 1 µl de cada iniciador, 2 µl de Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, Wi, EU), 2 µl de ADN bacteriano y 12.5 µl de H₂O grado molecular, con un volumen final de 25 µl por reacción

El PCR se llevó cabo en un termociclador de la marca ThermoHybaid™ (EU). Las condiciones del PCR se encuentran resumidas en el Cuadro IV. Finalmente se utilizaron 5µl de cada producto de PCR para realizar electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.5 µg/ml de Bromuro de Etidio durante 1.15 horas a 100 voltios. Los geles se observaron y fotodocumentaron en un transiluminador de luz ultravioleta UVP™ (EU).

Cuadro III. Iniciadores para la amplificación de los genes *typh* y *ENT*

Iniciadores	Secuencia	Pares de bases
<i>typh</i>	5'-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG-3'	401
	5'-TGA ACTACGTTTCGTTCTTCTGG-3'	
<i>ENT</i>	5'-TTGTTCACTTTTTACCCCTGA A-3'	304
	5'-CCCTGACAGCCGTTAGATATT-3'	

Cuadro IV. Condiciones de termociclador para PCR multiplex para la detección de los genes *typh* y *ENT*

Descripción	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 mins.	1
Desnaturalización	95°C	60 seg.	40
Alineamiento	48°C	30 seg.	
Extensión	72°C	30 seg.	
Extensión final	72°C	3 mins	1

Caracterización de genes de resistencia cmlA/tet TEM, PSE, SipB/Ca

Para la detección de los genes *cmlA/tet TEM*, *PSE*, *SipB/Ca* se utilizó el protocolo descrito anteriormente para la detección de los genes *typh* y *ENT*, tanto en la composición de la reacción de PCR, las condiciones del termociclador para la amplificación de los fragmentos y electroforesis. Los iniciadores se describen en el cuadro V.

El PCR se llevó cabo en un termociclador de la marca ThermoHybaid™ (EU). Las condiciones del PCR se encuentran resumidas en el Cuadro VI. Finalmente se utilizaron 5µl de cada producto de PCR para realizar electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.5 µg/ml de Bromuro de Etidio durante 1.15 horas a 100 voltios. Los geles se observaron y fotodocumentaron en un transiluminador de luz ultravioleta UVP™ (EU).

Cuadro V. Iniciadores para la amplificación de los genes *SipB/Ca*, *cmlA/tet*, *PSE-1*, *TEM*

Iniciadores	Secuencia	Pares de bases
<i>SipB/Ca</i>	5'-ACAGCAAATGCGGATGCTT-3'	232
	5'-GCGCGCTCAGTGTAGGACTC-3'	
<i>cmlA/tet</i>	5'-CGCTCCTTCGATCCCGT-3'	260
	5'-GCTGCGTTCATCTACAACAGAT-3'	
<i>PSE-1</i>	5'-TTTGGTTCCGCGCTATCTG-3'	132
	5'-TACTCCGAGCACCAAATCCG-3'	
<i>TEM</i>	5'-GCACGAGTGGGTTACATCGA-3'	291
	5'-GGTCCTCCGATCGTTGTCAG-3'	

*Cuadro VI. Condiciones de termociclador para PCR multiplex para la detección de los genes *SipB/Ca*, *cmlA/tet*, *PSE-1*, *TEM**

Descripción	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 mins.	1
Desnaturalización	95°C	60 seg.	40
Alineamiento	48°C	30 seg.	
Extensión	72°C	30 seg.	
Extensión final	72°C	3 mins	1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un muestreo por conveniencia con una periodicidad semanal durante el periodo de agosto a noviembre de 2018. En total fueron recolectadas 40 muestras por día de muestreo, dando un total de 200 muestras de heces de caninos.

De las 200 muestras se obtuvieron un total de 30 muestras sugestivas a *Salmonella* spp. de acuerdo a las características de crecimiento en medio de cultivo en agar entérico Hektoen (BD®), en el cual las colonias sugestivas a *Salmonella* spp. se observaron de color verde-azul verdoso con el centro negro. De acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas Triple Sugar Iron (BD®), medio citrato Simmons (BD®), sulfuro-indol-manitol (Acumedia®), Urea (BD®), agar hierro lisina (BD®), Rojo de Metilo (BD®), Voges Proskauer (BD®), oxidasa y catalasa se descartaron 17 muestras, dando un total de 13 muestras sugerentes a *Salmonella* spp. (Cuadro VI).

Cuadro VII. Resultados de pruebas bioquímicas a cepas sugestivas a *Salmonella* spp.

N	Cepa	Urea	Citrato	TSI	LIA	Indol	Oxidasa	Catalasa	Rojo Metileno	Voges Proskauer
1	19	-	+	+	+	-	+	-	+	-
2	39	-	-	-	-	-	+	+	+	-
3	51	-	+	+ SH2	+	-	+	+	+	-
4	53	-	-	-	-	-	+	+	+	-
5	67	-	+	+	+	-	+	+	+	-
6	70	-	+	+	+	-	+	+	+	-
7	114	-	+	+ sh2	+	-	-	-	+	-
8	133	-	+	+	+	-	+	+	+	-
9	151	-	+	+	+	-	+	+	+	-
10	192	-	+	-	+	-	+	+	+	-
11	193	-	+	+ sh2	+	-	+	+	+	-
12	50/17	-	+	+ sh2	+	-	+	+	+	-
13	85-b	-	-	+	-	-	+	+	+	-

Detección del gen invA

La prevalencia de *Salmonella* spp. Obtenida en el presente estudio fue de 2.5% (5/200) por medio de diagnóstico molecular por PCR. La prevalencia de *Salmonella* spp. Se encuentra dentro de los rangos entre los diferentes estudios que se han realizado, la cual va del 0 al 11%. En un estudio realizado por Lía (2009) utilizando la técnica de PCR para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de perros no se obtuvo resultados positivos. Contrariamente, Núñez (2016) obtuvo una prevalencia del 7.75% en perros, utilizando la técnica de serotipificación con antisuero polivalente y antisuero del grupo D. Asimismo, Ana et al. (2017) obtuvo una prevalencia del 2.9% de *Salmonella* spp. en cuyos por medio de diagnóstico molecular (PCR), prevalencia similar a la reportada por Hackett (2003) la cual fue de 3.6% utilizando el método micro-ID™. En otro estudio realizado por Tesai et al. (2007) reportaron una prevalencia del 2.1% en perros domésticos y 6.3% en perros callejeros. Rentería (2018) determinó una prevalencia del 7.65% de *Salmonella* spp. Utilizando pruebas bioquímicas, mientras que Kocabiyik et al. (2006) reportaron una prevalencia del 11% en perros utilizando la técnica de serotipificación. Dichas prevalencias en animales de compañía difieren de las reportadas en estudios con muestras de canales de ganado bovino, en los cuales se han encontrado prevalencias del 16.1% (Yáñez et al., 2008).

La salmonelosis es una enfermedad que afecta a animales domésticos como perros, gatos, cerdos, bovinos y a especies exóticas como tortugas, en las cuales se presenta de manera asintomática, principalmente. Así mismo, esta enfermedad suele estar sub-diagnosticada en animales de compañía. Las posibles razones de las diferencias en las prevalencias de *Salmonella* spp. en otros estudios comparadas con el presente estudio podrían deberse a las diferencias en las prácticas sanitarias de mascotas, diferencia en el nivel de conocimiento sobre la importancia de esta enfermedad zoonótica y por el estatus socioeconómico de los propietarios.

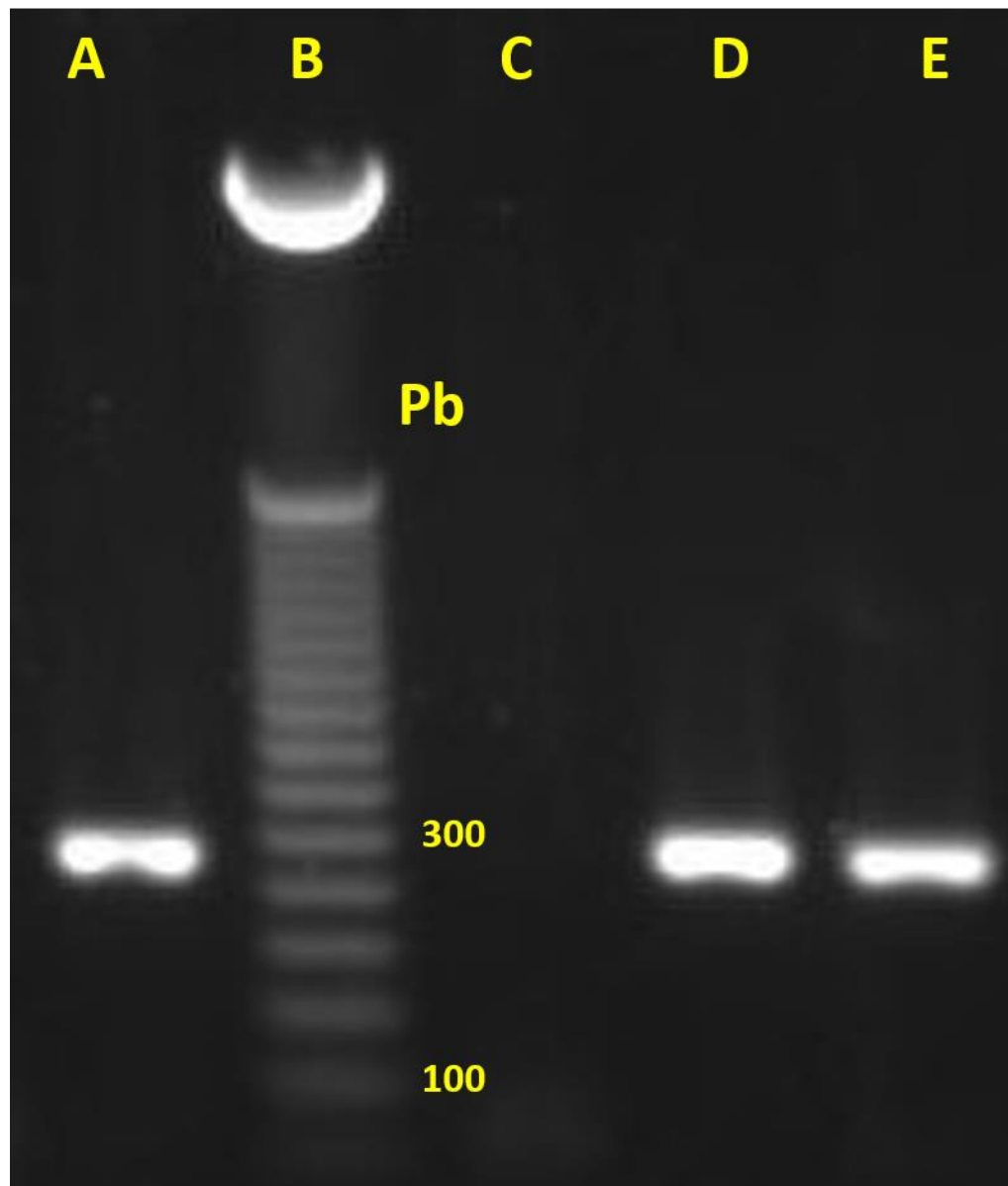


Figura III. Bandas de un fragmento de 284 pb del gen *invA* (Carriles A, D y E) en un gel de agarosa al 1.5%. Carril C: Control negativo. Carril B: Marcador de peso molecular DNA Ladder de 50 a 10000 pares de bases, (GeneRuler)

Detección de genes typh y ENT

Para la tipificación de las cepas se realizó un PCR multiplex para amplificar un fragmento de 401 pb del gen TYPH y un fragmento de 304 pb del gen ENT. De las muestras que se analizaron el 60% (18/30) se identificó como *Salmonella entérica* subespecie *typhimurium*, (Figura IV) estos resultados coinciden con los reportados por Ashra, et al. (2012) en el cual se obtuvo un 81% de muestras positivas a *S. typhimurium* en pollos de engorda. Asimismo, Ana (2017) obtuvo el 83% de *S. typhimurium* en cuyos. Por otro lado, Songsk et al. (2017) obtuvieron un porcentaje menor de subespecie Typhimurium (13.9%) en muestras de perros y gatos, al igual que Bitsu et al. (2017), los cuales reportan un 4% en muestras de perros y utilizando el método de serotipificación. Adicionalmente, Mohamed et al. (2017) reportaron un 15.2% en muestras de origen alimentario.

Estos hallazgos implican un riesgo potencial en la transmisión de la enfermedad, ya que el humano es una especie que se ve afectada por *S. typhimurium*, es decir, dicha serovariedad tiene propiedades zoonóticas, y al tener los humanos una estrecha relación con los perros se corre el riesgo de adquirir la bacteria y posteriormente desarrollar gastroenteritis, la cual puede llegar a ser mortal (Fábrega et al 2013; Jong et al 2012).

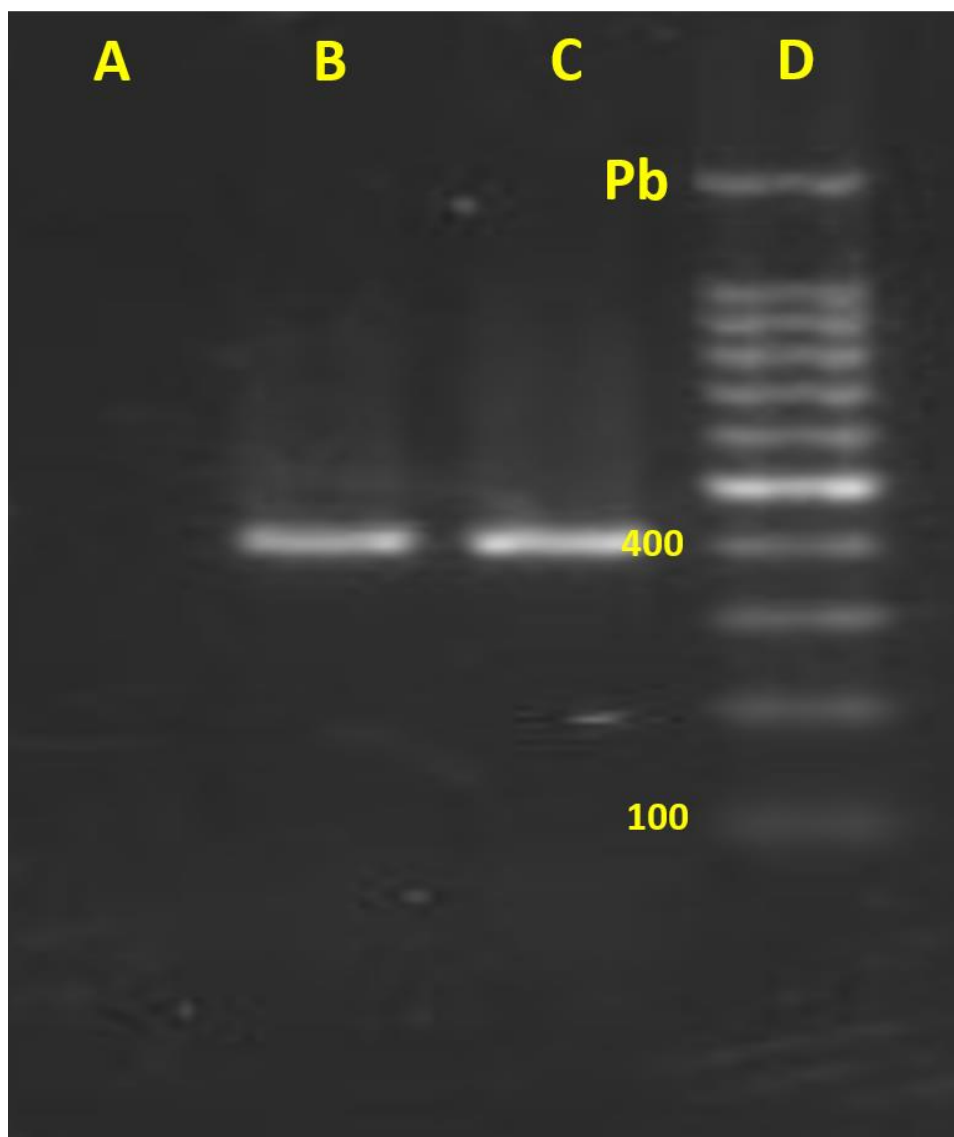


Figura IV. Bandas positivas a un fragmento de 401pb correspondientes al gen TYPH (Carriles B y C) en un gel de agarosa del 1.5%. Carril A: Control negativo. Carril D: Marcador de peso molecular de 100 a 1000 pares de bases, DNA Ladder (GeneRuler).

Antibiograma

En el antibiograma para el análisis de la resistencia a antibióticos se observó resistencia al menos a un agente antimicrobiano en todos los aislados de *Salmonella* (Cuadro VII). El 100% (30/30) de las muestras resultaron resistentes a ampicilina, cefepime y cefalotina. Por otro lado, 56.60% (17/30) mostró resistencia a cefotaxima, 16.66% (5/30) a cloranfenicol, 13.33% (4/30) a Trimetoprima-sulfametoxazol, 10% (3/30) a ceftriaxona y 6.66% (2/30) a Gentamicina, mientras que el 3.33%, (1/30) de las muestras mostraron resistencia a levoploxacin, nitrofuranteina y netilmicina. Para el antibiótico amikaina ninguna de las muestras resultó resistente (0/30). Del total, 13.33% (4/30) cepas presentaron la característica multidroga-resistente.

Los antibióticos B-lactámicos fueron los que presentaron mayor resistencia a excepción de ceftriaxona ya que del resto de los antibióticos analizados pertenecientes a esta familia, al menos 3 presentaron un 100% de resistencia. Los porcentajes reportados en el presente trabajo difieren de los reportados por Songsak et al. (2017) en el que la ampicilina presentó resistencia en el 50% de las muestras analizadas, sulfonamidas en el 100% y ceftriaxona en un 17.2%. En el presente estudio ampicilina fue mayor, mientras que ceftriaxona fue mucho menor, dichas variaciones podrían deberse a los diferentes usos de los antimicrobianos en animales de compañía en diferentes regiones geográficas. Por ejemplo, Leonard et al. (2011) encontró resistencia antimicrobiana a ampicilina en un 16,7%, 14.2% para cetiofur, 14.2% a ceftriaxona y 14.2% a cefoxitina, adicionalmente, reportaron un 14% de muestras multidroga resistentes, coincidiendo con los reportados en el presente estudio, mientras que Bitsu et al. Reportaron un 45% de cepas multidroga resistentes. De estas, ampicilina fue resistente en un 30.9%, mientras que cefalotina en 33.3% y ciprofloxacino en un 100% de las muestras. Por otro lado, Tsai et al (2007) encontraron que ampicilina mostraba resistencia en un 50% de las muestras, sulfametoxazol- trimetoprima en un 37.5% nitrofuranteina en 38.9%, cefalotina en 5% y cloranfenicol en el 52% de las muestras analizadas.

Cuadro VIII. Resultados de antibiograma

ANTIBIOTICO	# CEPAS			%		
	RESISTENTES	INTERMEDIAS	SENSIBLES	RESISTENTES	INTERMRDIAS	SENSIBLES
AK	0	1	29	0%	3.30%	96.66%
AM	30	0	0	100%	0%	0%
LEV	1	0	29	3.30%	0%	96.55%
CF	30	0	0	100%	0%	0%
CTX	17	12	1	56.60%	40.00%	0%
CRO	1	0	29	3.30%	0%	96.66%
CL	5	0	25	16.66%	0%	83.33%
GE	2	1	27	6.60%	3.30%	90.00%
NET	1	0	29	3.30%		96.66%
NF	1	0	29	3.30%	0%	96.66%
FEP	30	0	0	100	0%	0%
SXT	4	0	26	13.33%	0%	86.66%

AK: Amikacina; AM: Ampicilina; LEV: Levofloxacina; CF: Cefalotina; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; CL: Cloranfenicol; GE: Gentamicina; NET: Netilmicina; NF: Nitrofurantoina. FEP: Cefepime; SXT: Trimetoprima - sulfametoxazol

Detección de *cmlA/tet*, *SipB/C*, PSE y TEM

Finalmente se realizó un PCR para la identificación de genes de resistencia para el cual el 100% (30/30) de las muestras fueron positivas al gen *SipB/C* que codifica genes de resistencia para la familia de sulfonamidas (Figura V), 6.6% (2/30) amplificaron el gen *cmlA/tet* que proporciona resistencia a cloranfenicol, asimismo, el 16.6% (5/30) y 96.6% (29/30) de las muestras resultaron positivas para los genes PSE y TEM, respectivamente, los cuales corresponden al grupo de las ampicilinas (Figuras VI y VII). Adicionalmente, las muestras analizadas amplificaron a 2 o más genes de resistencia (Cuadro VI).

Respecto al gen TEM que confiere resistencia a la ampicilina, en el presente trabajo se presentó en el 96.6% de las muestras. En otros estudios se ha detectado el gen en el 40% de muestras aisladas de perros y gatos, (Sangsak et al. 2017) y 20% en bovinos (Ahmed et al 2011), mientras que Jiménez et al. (2010) reportaron un 2.9%. El gen TEM ha sido reportado como el B-Lactamasa más frecuente en *Salmonella* resistente a ampicilina en Europa. (Guerri et al 2004), además, está presente en más del 50% de los aislados de *Salmonella* spp. Y esto pudo deberse a múltiples factores como las dosis y/o la duración del tratamiento. El gen PSE, el cual también confiere resistencia a ampicilina se detectó en el 16.6% de las muestras, difiriendo con lo reportado por Talavera et al. (2011) que fue del 2.29% en aislados de cerdos y de Sangsak et al. (2017), que detectaron el gen en el 3.2% de muestras de perros y gatos. El gen *SipB/C* fue detectado en el 100% (30/30) de las muestras en el presente estudio, difiriendo con reportes anteriores para los cuales se mostró que el 62% de las muestras presentaban dicho gen (Talavera et al 2011). El gen *cmlA/tetR*, logró identificarse en un 6.6% de las muestras analizadas, porcentaje bajo comparado con los reportados por Talavera et al. (2011) y Sangsak et al. (2017) los cuales fueron del 57.4% y 60.7%, respectivamente.

Se han identificado genes de resistencia antimicrobianos de diferentes fuentes como suelo, agua alimento procesado, pollos y cerdos. Contrariamente,

sigue existiendo muy poca información sobre la presencia de genes de resistencia en aislados provenientes de perros. El presente estudio representa el primer trabajo de detección de genes de resistencia en *Salmonella* spp. En Baja California México.

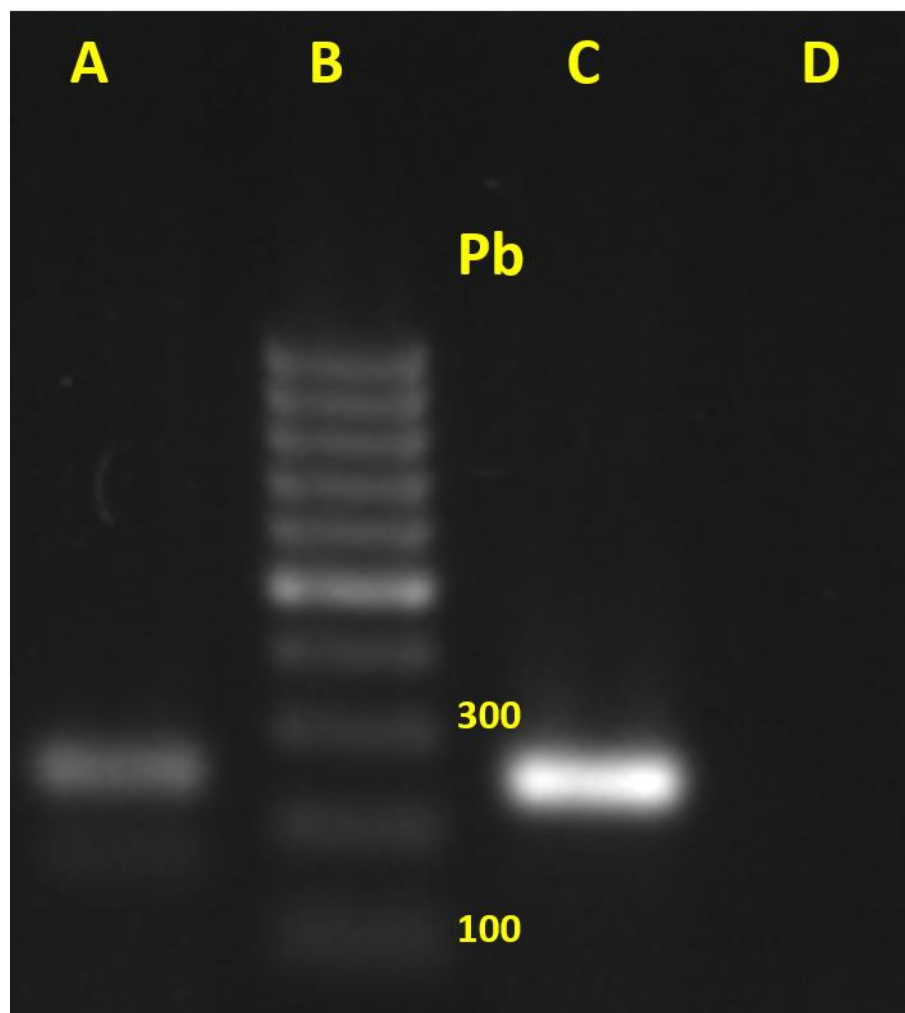


Figura V. Bandas positivas a un fragmento de 232pb correspondientes al gen sipB/C (Carriles A y C). Carril B: Marcador de peso de 100 a 1000pb, DNA Ladder (GeneRuler). Carril D: Control negativo.

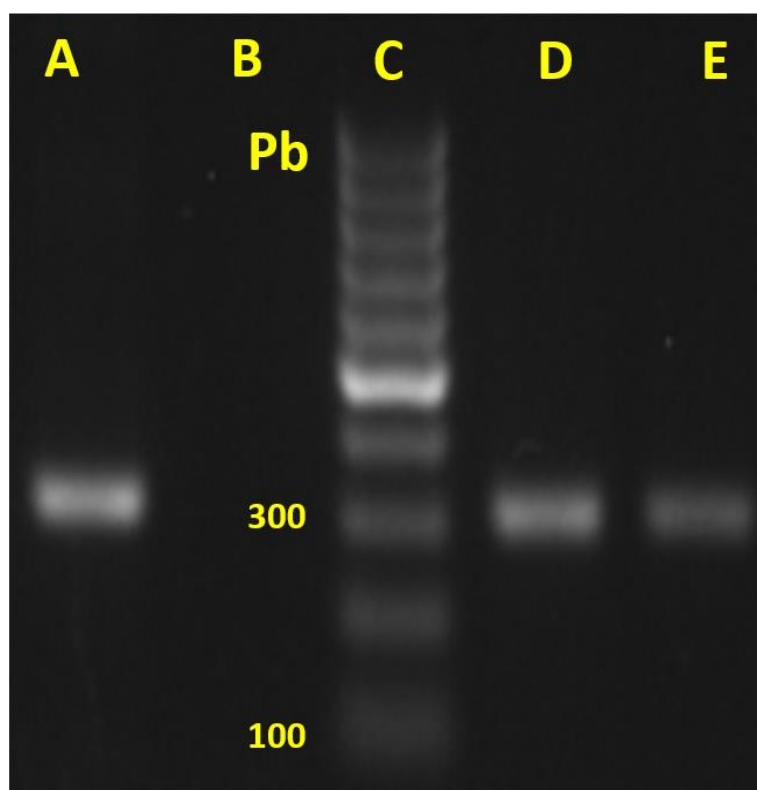


Figura VI: Bandas positivas a un fragmento de 291 pb. Correspondientes al gen TEM amplificado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (Carriles A, D y E). Carril B: Control negativo; Carril C: Marcador de peso de 100 a 1000pb, DNA Ladder (GeneRuler).

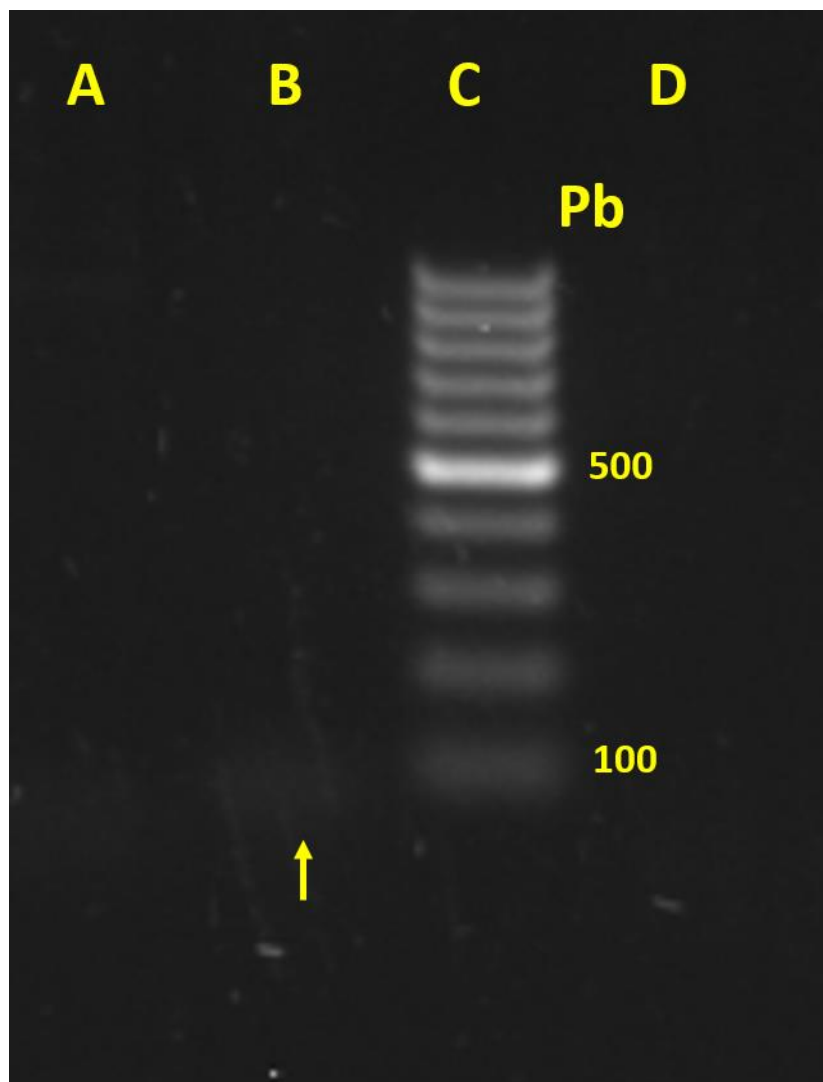


Figura VII: Bandas positivas a un fragmento de 132 pb. Correspondientes al gen PSE amplificado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (Carril B, flecha amarilla). Carril A: Muestra negativa; Carril C: Marcador de peso de 100 a 1000pb, DNA Ladder (GeneRuler); Carril D: Control negativo.

Cuadro XI: Resistencia fenotípica y genotípica en *Salmonella spp.*

Muestra	Serotipos	Antibiograma	Genes de resistencia
		(Fenotipo)	(Genotipo)
51	Thyp	AM,CF,NF,FEP,	sipB/C, TEM
70	Thyp	AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM PSE CmlA/tetR
120		AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM
133	Thyp	AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM
151	Thyp	AM,CF,FEP,	sipB/C
184	Thyp	AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM,
208		AM,CF,CL,FEP,	sipB/C, TEM, CmlA/tetR
267	Thyp	AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM
268		AM,CF,CTX,CL,FEP,SXT,	sipB/C, TEM, PSE,
296		AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM,
298	Thyp	AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM,
317	Thyp	AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM
335	Thyp	AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM
338		AM,CF,FEP	sipB/C, TEM
349		AM,CF,FEP,	sipB/C , TEM, PSE
352	Thyp	AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM
354		AM,LEV,CF,CTX,CRO,GE,NET,FEP,SXT,	sipB/C, TEM, CmlA/tetR
375		AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM
383	Thyp	AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM, CmlA/tetR
387		AM,CF,CTX,CL,FEP,SXT,	sipB/C, TEM, PSE,
396	Thyp	AM,CF,CTX,CL,FEP,SXT,	sipB/C, TEM, PSE,
398	Thyp	AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM

399	Thyp	AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM
411	Thyp	AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM
454		AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM
488		AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM
501	Thyp	AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM
437rv	Thyp	AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM,
437sc	Thyp	AM,CF,CTX,FEP,	sipB/C, TEM,
50/17		AM,CF,FEP,	sipB/C, TEM,

AK: Amikacina; AM: Ampicilina; LEV: Levofloxacina; CF: Cefalotina; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona ; CL: Cloranfenicol; GE: Gentamicina; NET: Netilmicina; NF: Nitrofurantoina. FEP: Cefepime; SXT: Trimetoprima - sulfametoxazol ; Thyp: typhimurium;

CONCLUSIONES

Se pretende continuar con el presente estudio de genes de resistencia a *Salmonella* spp. En perros ya que los resultados de este estudio indican que *Salmonella* spp. está presente en caninos de Mexicali, B.C., mostrando un porcentaje alto de *S. Typhimurium* siendo esta de carácter zoonótico lo que conlleva a un riesgo alto en la salud pública, dado el hecho de que hoy en día el perro tiene una estrecha relación con el humano siendo los niños los que presentan un mayor riesgo de contagio. Este estudio abre un panorama para poder llevar a cabo estudios más a fondo de todas las familias de antibióticos que se usan en la clínica veterinaria en la región, para de este modo poder implementar las medidas de control y regulación de uso de antibióticos pertinentes. Se tiene que tener un mayor control en el uso de antibióticos en clínica ya que hoy en día se están usando antibióticos de última generación o usando en enfermedades virales, lo cual acelera el proceso de resistencia por parte de bacterias.

LITERATURA CITADA

- Aries. B., I. Meza., L. Ana. 2004. Resistencia antimicrobiana de Salmonella, *Shigella* y *Vibrio cholera*, Perú 1997-2002 Revista Peruana de Medicina experimental y salud publica Vol. 2, núm. 4 octubre-diciembre pg. 273-275 Lima Perú
- Ashraf. M.a., T. Shimamoto. 2012. Genetic analysis of multiple antimicrobial resistances in salmonella isolated from diseased Broilers on Egypt (2012) micro boil immunol. 56. 254-261.
- Belén. V. M. 2015. Comparación de los perfiles genéticos de resistencia antimicrobiana de cepas de salmonella entérica obtenidas de distintos hospedadores en Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias veterinarias. Santiago Chile.
- Carlson, S. a., Bolton. L.F., C.E. Briggs., H.S. Hurd., V.K. Sharma., P.J.Fedorka-Caray., B.D, Jones. 1999. Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT using multiplex and fluorogenic PCR. Molecular and cellular probes (1999) 13, 213-222
- Chero. O., R. Rosadio., D.M. Marcelo., G.O. Díaz., R.A. Jiménez., Y.G. Castro., L.H. Maturrano. 2017. Identificación molecular de *Salmonella typhimurium* en cuyos al primer parto mediante la técnica de PCR multiple. Rev. Inv. Vet. Peru, 28(3): 679-686.
- Cuevas, O., J. L. Félix., m, j, Edeza., C.C. Quiroz. 2009. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. Rev. fitotec. Mex. Vol. 32 (2) 119-126,
- De Jong, H. K., C. M. Parry., T Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. 2012. Journal List [PLoS Pathog](#) v.8(10); 2012 Oct PMC3464234.

- Faberge. A., J. Vila. 2013. *Salmonella entérica* serovariedad typhimurium, habilidades para tener éxito en el huésped, virulencia y regulación. Clin microbiol Rev. abril; 26(2) pg 308-341. PMID: PMC 3623383.
- Feliz. G. C. 2011 Salmonelosis porcina en España, prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana Universidad de León Tesis de Doctorado.
- Fonnegra. P.D.L., L.M.G. Lordoño., C.Hernandez. 2009. Prevalencia de *Salmonella* spp, en perros del centro de bienestar animal la perla en medellin Colombia. Rev CES. Vol 4. No 2. Jul-Dic. ISSN 1900-9607.
- Geo. F. B., S. A. Morse., K. C. Carroll., T. A. Mietzner., J. S. Butel. 2011. Jowitz, Melenick y Adelberg Microbiología Medica 25ª edición. Ed Mc Graw Hill. Pg. 222-225.
- Guerri. L.M., A.Aladueña., A. Echeita., R.Rptger. 2004. Detection of integrons and antibiotic- resistance genes in salmonella enterica serovar typhimurium isolatrd with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. International journal of antimicrobial agent 24. (2004) pp327-333.
- INFOSAN. 2005. Resistencia antimicrobiana a salmonella., Red internacional de autoridades de inocuidad de alimentos.
- Jean. B.P., F.R Cockerill., J. Alder. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fourth informational supplement. M100-s24. Vol 34. No 1 Clinical and Laboratory Standards institute.
- Junod. T.J., M. Lopez., P. Gadicke. 2013. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de salmonella entérica en muestras de origen animal y alimentario Rev. med Chile 142; pg 298-304.

- Kiflu.B, A. Hile., A. Mutarin., Y.Negash., T. Egsuale. 2017. *Salmonella* serotypes and their antimicrobial susceptibility in apparently healthy dogs in addis ababa Ethiopic. BMC. Vet R. !3: 134.
- Kocabiyik.A.L., C. Cetin., D. Dedicova. 2006. Detection of *Salmonella* spp, in stray dogs in Burs province, turkey first isolation of salmonella Corvallis from dogs. J.Vet.Med. B. 53. Pp194-196. ISSN0931-1793.
- Lapierre. L., C. Toro., B. San Martin. 2010. Estudio de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp, aisladas de aves y cerdos de producción. [S.l.], v. 25, n. 1-2, ene.
- Leonrd.K.E., D.L.Pearl., R.L. Finley., N. Jonecko., J.R Reid-smith., A.S. Peregrine., J. Scott Weese. 2011. Comparison of antimicrobial resistance patterns of salmonells spp and *Escherichia coli* recovered from pet dogs from volunteer households in Ontario (2005 06). J antimicrob chemother 2012, 67: pp 174-181.
- López. H. C. 2004. Comparación de PCR en tiempo real y cultivo bacteriológico, en la detección de *Salmonella typhimurium* en pollos. Universidad de Chile. Santiago Chile.
- Malbran. G. C. 2005. Manual de procedimientos. Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Servicio Enterobacterias departamento de bacteriología Buenos Aires Argentina.
- Ortega C. R. 2008. Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella* spp. Universidad de Barcelona departamento de Microbiología.
- Pedraza. J. G., N. S. Dereira., Z. V. Soto., E. A. Hernández., J. C. Villareal. 2004. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp y herramientas moleculares para su detección. Salud uninorte barranquilla (col.) 2014 30 (1) 73-94.

- Picazo. J.J. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica.
- Puig. P. Y., V. L. Castillo., T. K. M. Zagovalov., 2008. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp aisladas de alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA) Rev. Habana cienc med La Habana Vol. VII No.2 abril-junio.
- Puig. P. Y., M. E. Hernández., V. L. Castillo., T. K. M. Zagovalov., D.M. Morales., P. S. Rodríguez., Y. F, Márquez. 2007. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. de origen clínico y alimentario, Rev. panam infectal, 9(3) 12-16.
- Rincón. O., J. Figueroa. 2008. Prevalencia serológica de *Salmonella* enteritidis en la población canina del municipio de tunja, Colombia. Rev Salud publica 10(3) 470-476.
- Rivera. L.G.C., P.A.D. Motta., M.F.U. Ceron., F.A.C. Chimonja. 2012. Resistencia de la *Salmonella* a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. Rev CES, Med. Vet. Zoo. Vol 7 No 1. Pp 116-129. Medellin Colombia.
- Rodríguez. C. H., M. C. Bogdanowicz., E.C. M. Caffer., D. García., M. B. Lasala., C. V. A. Famislietti. 2007. Salmonelosis extraintestinal: clínica, epidemiología y resistencia a antimicrobianos. acta bioquímica clínica latinoamericana. Vol. 4, num 3 julio-sep pg 379-383 Buenos Aires Argentina ABCL
- Rojas. T. M. J. A.G. Varela., N. E. R. Reyes., S. B. Lagunas., B. C. Valladares., M.U.A. Freson. 2011. Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *salmonella* spp en cerdos sacrificados en rastros del estado de México. Vet. Mex 42(4) 2011 pg 269-275.

- Sacsaquispe. C.E. R., J. P. Velázquez. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Ministerio de salud del Perú. Instituto Nacional de Salud. Serie de normas técnicas N.30 Pg 13-19 y 32.
- Sonssaks., S. Angkittrakul., P. sringm., P.T. Le Ho., A.T. Vo. R. Chuonchuen. 2017 Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes of *Salmonella enterica* isolated from pet dogs and cats.
- Talavera. R.M., J.A.V. Guerrero., N.E.R. Rodriguez., S.L.Bernabe., B.V.Carranza., M.U.A. Fresan., V.V. Ordoñez. 2011. Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de salmonella spp de cerdos sacrificados en rastros del estado de mexico., *Vet. Mex.*, 42 (4).
- The Center for food security & public health. 2005. Salmonellosis paratyphi no tifoidea. Institute for international cooperation in animal biologics Iowa state university.
- Tsi. H.J., H.C. Huang., C.M. Lin., Y.Y. Lien., C.H. Chou. 2007. Salmonella and campilobacters in house hold and story dogs in northern Taiwan. *VRC*, 31: 931-939
- Wiesner. M., J. J. Calva., V. H Bustamante., D. P. Morales., M. F, Mora., E. Calva., C. Silva. 2016. Una cepa (3376) humana invasiva resistente a múltiples fármacos *Salmonella Typhimurium* ST213 que contiene el gen bla CMY-2 en un plásmido IncF se atenúa para la virulencia en ratones BALB/c. *BMC Microbiology* 16: 18.
- Yañez.E., S. Mattor, Durango. Determinacion de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Monteria, Cordoba. 2008. Vol 12, No 4.