



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**“CARACTERÍSTICAS DE LA RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA DE AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA*
ENTERICA EN BOVINOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO
REGIONAL NOROESTE, DILAVE “MIGUEL C. RUBINO”,
PAYSANDÚ URUGUAY”**

VÍCTOR SANTIAGO RODRÍGUEZ OVIEDO

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2022



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**“CARACTERÍSTICAS DE LA RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA DE AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA*
ENTERICA EN BOVINOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO
REGIONAL NOROESTE, DILAVE “MIGUEL C. RUBINO”,
PAYSANDÚ URUGUAY”**

VÍCTOR SANTIAGO RODRÍGUEZ OVIEDO

Dr.(Msc) Rodolfo Rivero

Director de Tesis

Dr. (Msc) Edgardo Giannechini;

Dr. Martin Fraga

Co-directores

2022

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Rodrigo Puentes; DCV, MS, PhD

Departamento de Ciencias Microbiológicas,
Área de Bacteriología, Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay

Alejandra Suanes; DCV, MS

Departamento Bacteriología,
Division de Laboratorios Veterinarios (DILAVE)
Ministerio de Ganaderia Agricultura y Pesca (MGAP)-Uruguay

Pablo Zunino; DMV, MS, PhD

Departamento de Microbiología,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)
Universidad de la República – Uruguay

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: Salud animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: FVet, 29/11/2022

TRIBUNAL: Rodrigo Puentes, Pablo Zunino, Alejandra Suanes

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
5032368- 4	Rodríguez Oviedo, Víctor Santiago	555	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

Alejandra Suanes

PABLO ZUNINO

R. Puentes

TRIBUNAL

FIRMA

Montevideo 29/11/22
Acta de tesis de Maestría en Salud animal – PPFVET

La presente tesis investigó sobre el "CARACTERÍSTICAS DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE AISLAMIENTOS DE SALMONELLA ENTERICA EN BOVINOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO REGIONAL NOROESTE, DILAVE "MIGUEL C. RUBINO", PAYSANDÚ URUGUAY". Se trata de un tema de mucha importancia para la salud, tanto humana, como animal y ambiental. El texto de la tesis está muy bien escrito, con una fundamentación clara de los objetivos propuestos. El abordaje metodológico fue adecuado y preciso, dando solidez a los hallazgos obtenidos.

Los resultados son contundentes y originales, realizándose varios aportes importantes para el país, y que permitirán avanzar en esta temática de crítica relevancia en el contexto de "una salud"

En relación a la exposición realizada, la misma fue muy clara y ordenada, destacando los principales aspectos de la tesis. Además, el Dr. Víctor Rodríguez fue sólido a la hora de responder las preguntas del tribunal.

Se sugiere la incorporación de las modificaciones planteadas antes de realizar la impresión final de la tesis.

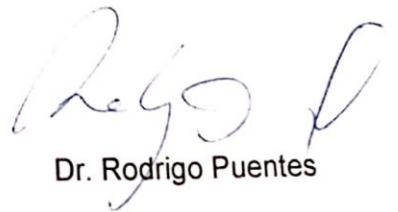
En resumen, se trata de una tesis muy bien estructurada y planteada, con resultados claros y contundentes. La exposición fue destacable, demostrándose la alta capacidad del Dr. Víctor Rodríguez, así como su solidez para responder las preguntas realizadas por el tribunal. En base a estas valoraciones, este tribunal otorga la calificación de APROBADO CON MENCION (12), felicitando al Dr. Rodríguez y a sus tutores por el trabajo realizado.



Dr. Pablo Zunino



Dra. Alejandra Suanes



Dr. Rodrigo Puentes

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, quiero expresar gratitud a mis tutores: Rodolfo Rivero, Edgardo Giannechini y Martin Fraga por su constante apoyo, consejos, enseñanzas y principalmente mostrarme el camino de la investigación.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Salud Animal por el apoyo financiero al proyecto de investigación en el entrenamiento y puesta a punto de PCR multiplex para la serotipificación de *Salmonella*. Principalmente a Martin Fraga y su equipo.

A la DILAVE Regional Noroeste, Paysandú del MGAP, por permitirme desarrollar el presente trabajo de investigación, por brindarme materiales y equipamiento necesario.

A la Dra. Lucia Grille y al Dr. Pablo Parodi por sus consejos oportunos, así como su predisposición para ayudarnos en todo momento.

A todos mis compañeros y amigos de DILAVE, Paysandú por el compañerismo, amistad y apoyo en las diferentes actividades que involucraron el presente trabajo. Muchas gracias por el estímulo permanente y por hacerme sentir como en casa.

A la Dra. Ximena Salaberry por su buena disposición y colaboración con los aislamientos de *Salmonella* provenientes de DILAVE Montevideo.

Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene en especial al Dr. Rafael Vignoli y su equipo por su apoyo en la capacitación para métodos fenotípicos y genotípicos de resistencia antimicrobiana.

FATRO por su buena disposición y apoyo en la compra de material para poder llevar a cabo el test de concentración inhibitoria mínima.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, por permitirme continuar mi formación profesional y desarrollar mis estudios de posgrado.

Al Tec. Químico Marcos Schanzembach por ayudarnos en la traducción al inglés.

A Emiliano Rivas, Sheila Segundo e Ignacio Rivas hacerme el aguante en el último tramo de esta etapa.

A mi familia y amigos, por estar siempre presente y apoyarme en los diferentes proyectos de vida, especialmente a mis Padres, hermanos y sobrinos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
1- INTRODUCCIÓN	1
2- ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	2
2.1- Salmonelosis	2
2.2- Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	3
2.3- Identificación de <i>Salmonella</i>	4
2.4- Resistencia a los antimicrobianos	5
2.5- Caracterización de la sensibilidad antimicrobiana.....	6
2.6- Resistencia por BLEE.....	7
2.6.1- BLEE tipo TEM y SHV	8
2.6.2 BLEE tipo CTX-M.....	8
2.7- <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104.....	8
3- CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	9
4- HIPÓTESIS	10
5- OBJETIVOS	10
5.1- Objetivo general:.....	10
5.2- Objetivos específicos	10
6- MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1- Serotipificación.....	12
6.2- Caracterización fenotípica de la sensibilidad a antibióticos	12
6.2.1-Disco Difusión Agar	12
6.2.2-Microdilución en Placa	12
6.3- Detección fenotípica de BLEE tipo CTX	13
6.3.1- Criterios para categorizar multirresistencia	14
6.4- Extracción de ADN.....	14
6.5- Identificación de <i>Salmonella</i>	14

6.5.1-Detección del gen <i>invA</i>	14
6.5.2-PCR multiplex antígenos somáticos (genes <i>tyvD</i> y <i>wzx</i>)	14
6.5.3-PCR multiplex antígenos flagelares fase 1	15
6.5.4-PCR multiplex antígenos flagelares fase 2	16
6.6.1-Detección de genes de resistencia a los betalactámicos mediado por enzimas tipo TEM, SVH, CTX-M	17
6.7-PCR para la detección de <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104.....	17
7. RESULTADOS.....	18
7.1- Confirmación de género <i>Salmonella</i> a través del gen <i>invA</i>	18
7.3- Disco Difusión Agar (DDA).....	22
7.3.1- Test de sinergia en disco.....	23
7.4- Concentración inhibitoria mínima (CIM)	23
7.5- PCR <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104	25
7.6- Detección de genes de resistencia a los betalactámicos tipo TEM, SVH, CTX-M.....	26
8- DISCUSIÓN.....	29
9- CONCLUSIONES.....	32
10- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
11- Anexo	44
Anexo I. Resultados obtenidos PCR multiplex para tipificación de los aislamientos de <i>Salmonella enterica</i>	44
Anexo II. Patrones de resistencia fenotípica en disco y CIM de los 107 aislamientos.....	45
Anexo III: Numero de clases de antibióticos resistentes de los 107 aislamientos de <i>Salmonella</i>	45
Anexo IV: Patrones de resistencia en disco de los aislamientos positivos al gen <i>ST104</i>	45

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1: Método del doble disco para la detección de BLEE.	13
Figura 2: Confirmación genética de aislamientos identificados fenotípicamente como <i>Salmonella</i> spp., por amplificación del gen <i>invA</i> a través de PCR a tiempo final.	18
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR Multiplex Antígenos Somáticos	19
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR Multiplex Antígenos flagelares 1.....	20
Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR Multiplex Antígenos flagelares1.....	20
Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR Multiplex Antígenos flagelares 2.....	21
Figura 7: Método del doble disco para la detección de BLEE.....	23
Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR ST 104 en aislamientos tipificados como <i>Salmonella</i> Typhimurium positivas <i>ST104</i>	25
Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR gen <i>PanCTX-M</i> en aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.	27
Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR gen <i>bla_{TEM}</i> en aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.....	27
Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR gen <i>bla_{SHV}</i> en aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.....	28
Cuadro I: Focos de <i>Salmonella enterica</i> distribuidos por Departamentos. ...	11
Cuadro II: Cebadores utilizados detección de <i>Inv-A</i>	14
Cuadro III: Cebadores para detección de antígenos somáticos <i>Salmonella</i> . ..	15
Cuadro IV: Cebadores para detección de antígenos flagelares fase 1	16
Cuadro V: Cebadores para detección de antígenos flagelares fase 2.....	16
Cuadro VI: Cebadores para detección de genes de resistencia β -lactamasas.	17
Cuadro VII: Serovares de <i>Salmonella</i> spp. obtenidos en los 107 aislamientos.	19
Cuadro VIII: Porcentajes de resistencia obtenidos por el método de disco de los 107 aislamientos de <i>Salmonella enterica</i>	22
Cuadro IX: Porcentajes de resistencia obtenidos por el método de disco de los 107 aislamientos de <i>Salmonella enterica</i>	24

Cuadro X: Porcentajes de resistencia obtenidos por el método de disco de los 107 aislamientos de <i>Salmonella enterica</i>	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATB- Antibiótico
- BLEE- Betalactamasa de espectro extendido
- CBM- Concentración bactericida mínima
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
- CTX-M- Betalactamasa de tipo CTX-M
- DILAVE - Dirección de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino”
- DT104- *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT104
- ETAs – Enfermedades transmitidas por alimentos
- EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FDA – Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration)
- Gold standard- Método, tratamiento o criterio de referencia
- I- Sensibilidad disminuida
- MDR – Multirresistencia (del inglés multi-drug resistance)
- MGAP- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
- CIM – Concentración inhibitoria mínima
- MSP- Ministerio de Salud Pública
- OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal
- OMS / WHO – Organización Mundial de la Salud
- PCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PNCRA - Plan Nacional de Contención de la Resistencia Antimicrobiana
- R- Resistente
- RAM- resistencia antimicrobiana
- S – Sensible
- SPT-1- Isla de Patogenicidad 1
- TEM- Betalactamasa de tipo TEM
- SVH- Betalactamasa de tipo SHV

RESUMEN

Salmonella enterica afecta gran número de especies, dentro de ellos se encuentran los rumiantes y el hombre. Es uno de los principales agentes causales de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) a nivel mundial. Por este motivo es de suma importancia el monitoreo de resistencia antimicrobiana (RAM) en este tipo de microorganismo, dado que el incremento de estos patógenos genera preocupación en los sistemas de salud por la falta de eficacia en los tratamientos conduciendo a fracasos terapéuticos, aumentando la duración de la hospitalización y mortalidad. El objetivo de este estudio fue la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos a partir de brotes bovinos recibidos en el Laboratorio Regional Noroeste de Paysandú de Uruguay. Se partió de un banco de 107 aislamientos de *Salmonellas enterica* provenientes de casos clínicos en bovinos remitidos al laboratorio en el periodo comprendido 2014-2021. Todos los aislamientos resultaron positivos al gen *invA* confirmando el género de *Salmonella*, repartidos en 6 serovares Typhimurium, Dublin, Enteritidis, Montevideo, Anatum, Give. El 6,5 % de los aislamientos fueron productores de betalactamasas de espectro extendido de tipo CTX-M. Mientras que 39 de las 69 *Salmonella* Typhimurium aisladas fueron positivas al gen *ST104* confirmando la presencia fagotipo DT104. El 93,7% (100/107) de los aislamientos fueron resistentes por lo menos a un antibiótico, de estos el 26,1% (28/107) presentaron multirresistencia en disco. Los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia en nuestro trabajo fueron tetraciclinas 31,8% estreptomicina 27,0% y ampicilina 17,7%. La detección de *Salmonella entérica* productoras de β -lactamasas de espectro extendido, así como la variante de *Salmonella* Typhimurium DT 104 son de los primeros reportes en bovinos en Uruguay.

SUMMARY

Salmonella enterica affects a wide range of species, among these, ruminants and humans. It is one of the main causative agents of foodborne diseases worldwide. For this reason, it is extremely important to monitor antimicrobial resistance (AMR) in this type of microorganism. Mainly due to concerns in health systems on the grounds of the increase of these pathogens. Which leads to lack of efficacy in treatments, resulting in therapeutic failures, increasing the length of hospitalization and mortality. The aim of this work was the phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates obtained from bovine outbreaks received at the Northwest Regional Laboratory of Paysandú, Uruguay. A bank of 107 isolates of *Salmonella enterica* from cattle clinical cases sent to the laboratory in the period 2014-2021 was used for this study. All isolates were positive for the *invA* gene, confirming the *Salmonella* genus, distributed into 6 serovars, Typhimurium, Dublin, Enteritidis, Montevideo, Anatum and Give. From these isolates, 6.5% were producers of extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M type. While 39 of the 69 isolated *Salmonella Typhimurium* were positive to the *ST104* gene, confirming the presence of the phage type DT104. Resistance to at least one antibiotic was present in 93.7% (100/107) of the isolates. Within these, 26,1% (28/107) manifested disc multiresistance. The antibiotics with the highest percentages of resistance were tetracyclines 31.8%, streptomycin 27.0% and ampicillin 17.7%. The detection of extended-spectrum β -lactamases producing *Salmonella enterica*, as well as the variant *Salmonella Typhimurium* DT 104, are among the first reports in Cattle in Uruguay.

1- INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa que afecta al hombre y los animales (zoonosis), causada por bacterias del género *Salmonella*. Es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) más extendida a nivel mundial, ocasionando grandes pérdidas económicas (Kirk, 2015). Se reporta que 93,8 millones de personas enferman a nivel mundial y más de 150 mil muertes son causadas anualmente por este microorganismo (OIE, 2008; Majowicz et al., 2010). En Uruguay las ETAs constituyen un problema grave y creciente, siendo la salmonelosis la de mayor número de diagnósticos dentro de estas con 18 brotes en el año 2017 de acuerdo al Ministerio de Salud (MSP, 2017). Es una enfermedad de frecuente diagnóstico en bovinos, ocasionando pérdidas por muertes de animales y costos de tratamientos. La enfermedad puede afectar a todas las especies de animales domésticos, siendo más afectados los animales jóvenes. En bovinos presenta principalmente tres formas clínicas: entérica, septicémica y abortos (OIE, 2018; Mohler et al., 2009), los signos clínicos más frecuentes son entéricos.

A nivel mundial, se hace creciente la demanda de alimentos seguros, y de sistemas de vigilancia para garantizar la inocuidad de los mismos. El control y la detección de productos contaminados genera grandes pérdidas y restricciones a nivel comercial (Mather et al., 2011; Jajere et al., 2019).

Uno de los principales desafíos para lograr satisfacer la demanda de alimentos seguros, es el alto consumo de antibióticos para tratamientos, profilaxis de enfermedades infecciosas, o como promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano (Eng et al., 2015). Desafortunadamente, el uso extensivo de antibióticos en los sistemas de producción o mal uso de los mismos ha llevado a la aparición de cepas bacterianas resistentes a agentes antimicrobianos (RAM). El incremento en el aislamiento de patógenos resistentes a múltiples agentes, genera preocupación en los sistemas de salud por la falta de eficacia en los tratamientos conduciendo a fracasos terapéuticos, aumentando la duración de la hospitalización y mortalidad (Aarestrup, 2005; Eng et al., 2015). Los bovinos son una de las fuentes de contaminación y difusión cada vez más importante en relación a la RAM (Alexander et al., 2009). Una prueba de esto es el aumento en la frecuencia de aislamientos de *Salmonella* resistente con producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Por otro lado, se ha encontrado una variante epidémica de *Salmonella* Typhimurium (DT104) con un amplio patrón de resistencia a los antibióticos. Esto es importante en relación a salud pública, debido a que el tratamiento de infecciones invasivas de *Salmonella*, que comúnmente ocurren en niños, se sustenta principalmente en el uso de cefalosporinas de amplio espectro (Sugawara, 2011).

Dada esta situación, se plantea como necesaria y primordial para la Salud Animal y Pública, realizar estudios de vigilancia de resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos en bovinos, complementando con el desarrollo de

técnicas moleculares que permitan monitorizar los mecanismos de resistencia y detectar la aparición de clonas con resistencia múltiple.

2- ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1- Salmonelosis

La enfermedad puede afectar a todas las especies de animales domésticos, la principal vía de transmisión de la infección es fecal-oral, siendo los más susceptibles los animales jóvenes, gestantes, o lactantes (Radostits et al., 2002; Veling et al., 2002). En bovinos la transmisión se encuentra relacionada a la exposición a condiciones de estrés como el transporte, enfermedades concomitantes, tratamientos con antibióticos o antiparasitarios, partos, cambios de dieta, vacunaciones y presencia de animales portadores asintomáticos. Estos últimos excretan *Salmonella* en heces y leche, manteniéndose como fuente de infección en el rodeo (Radostits et al., 2002; Veling et al., 2002). También puede ser introducida por roedores, aves o subproductos alimentarios contaminados (Veling et al., 2002). Fossler et al. (2004) determinaron su presencia en materia fecal 4,8% de bovinos sanos (portadores). La presentación de la enfermedad se da principalmente entre la segunda y sexta semanas de vida en bovinos (Coura et al., 2015). Suele tener una morbilidad alta de más del 50% en terneros menores de 12 semanas, con una mortalidad cercana al 100% si no se instaura tratamiento (Radostits et al., 2002).

Los signos clínicos más frecuentes de salmonelosis son los entéricos, pero se puede observar un amplio espectro de estos, que incluyen septicemia aguda, aborto, artritis y enfermedad respiratoria. En bovinos esta se manifiesta principalmente en tres formas clínicas: entérica, septicémica y abortos, siendo la neumonía una manifestación común en infecciones producidas por *Salmonella* Dublín (OIE, 2008; Mohler et al., 2009). La severidad y la duración de la enfermedad clínica en terneros están relacionadas con la virulencia de la cepa, desafío, edad, eficiencia de la inmunidad pasiva, nutrición y grado de estrés (Radostits et al., 2002).

Las bacterias del género *Salmonella* son Gram-negativas, aerobias o anaerobias facultativas, móviles con excepción de los serotipos adaptados a las aves: *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Pullorum (Radostits et al., 2002; Caffer et al., 2008). Pertenece a la familia de las enterobacterias, dentro del género se reconocen dos especies actualmente, *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica* (Egualé et al., 2016; Graziani, 2017). Esta última se divide en seis subespecies, siendo la subespecie *enterica* la de mayor relevancia para animales y el hombre. Clásicamente, los aislamientos de *Salmonella enterica* se identifican y tipifican mediante métodos fenotípicos, como perfiles bioquímicos, serotipificación y fagotipificación (Eng et al., 2015; Graziani, 2017).

Se han identificado más de 2500 serotipos diferenciados por su composición antigénica, los que se basan en antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (VI) (Caffer et al., 2008; OIE, 2008; Dykes, 2015; Graziani, 2017). Estos antígenos son muy diversos, con 64 variantes “O” y 114 “H” identificadas. La mayoría de los laboratorios que realizan tipificación, utilizan la reacción de aglutinación con antisueros específicos para los antígenos somáticos “O” con la intención de clasificar en seis serogrupos, denominados A, B, C1, C2, D y E (Wattiau et al., 2011). Este sistema de agrupación proporciona información valiosa para estudios epidemiológicos (Wattiau et al., 2011). A pesar de la diversidad de serovares, relativamente pocos son de importancia clínica, la mayoría de los aislamientos en bovinos de *Salmonella* pertenecen a los grupos B, C y E, que no son específicos de un huésped, o *Salmonella* Dublin (grupo D), que es el serotipo adaptado a bovinos (Fosler et al., 2004), Este último junto con *Salmonella* Typhimurium son los principales serotipos que causan enfermedad en esta especie (Hirish y col., 2004). En tanto *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) y *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) se asocian aproximadamente al 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos (Lamas et al., 2018; Chen et al., 2019). En Uruguay *Salmonella* spp. es frecuentemente aislada en casos entéricos de bovinos. En este sentido Schild. (2017), describió un 15,4% de mortalidad en terneros (0-70 días) donde la diarrea era en el 95% de los predios estudiados el principal signo clínico. Caffarena et al. (2021), describieron que de un total de 535 terneros estudiados el 3,9 % de los terneros eran positivos a *Salmonella*. Los serotipos reportados en bovinos en nuestro país son *S. Typhimurium*, *S. Dublin* y *Salmonella* Anatum (Casaux et al., 2019).

2.2- Enfermedades Transmitidas por Alimentos

En las últimas décadas, la globalización en el suministro de alimentos ha significado que los patógenos que causan enfermedades transmitidas por los mismos, se transporten rápidamente a través de las fronteras internacionales. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son de especial importancia en salud pública a nivel mundial (Majowicz et al., 2010; Hur et al; 2012). Las mismas se producen a partir de algunos alimentos de origen animal, como carnes y huevos contaminados, procedentes de animales portadores, que son su reservorio natural (Hur et al; 2012; Kirk, 2015; Guerrero et al., 2021). La salmonelosis en el humano se manifiesta clínicamente por gastroenteritis aguda (diarrea y vómitos) que en algunos casos lleva a la muerte especialmente en pacientes inmunodeprimidos, niños recién nacidos y/o ancianos (Alexander et al., 2009). Dentro de los agentes más importantes de las ETAs encontramos a *Salmonella enterica*, *Norovirus*, *Campylobacter* spp. *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, teniendo los brotes producidos por éstos efectos negativos en el comercio y la seguridad alimentaria (Majowicz et al., 2010; Scallan et al., 2015). Por ello, las infecciones causadas por *Salmonella enterica* en humanos son un problema de salud pública. En Estados Unidos se estima que ocurren 1,4 millones de casos de salmonelosis cada año, con 26.500 hospitalizaciones y 420 muertes; el 95% son el resultado de la transmisión por alimentos (Hur et al; 2012; OIE, 2018; Majowicz et al., 2010; Abu Aboud et al., 2016).

Entre los causantes de ETAs, *S. enterica* ocupa el primer lugar como causa de hospitalización y de muertes (Scallan et al., 2011). *S. Dublin* es particularmente invasiva en humanos produciendo una infección septicémica, lo que conlleva al desarrollo de una enfermedad grave con alta mortalidad comparada con otros serotipos. Es un serotipo adaptado al bovino como huésped, donde la carne, la leche cruda y quesos elaborados con leche cruda son los vehículos típicos para el desarrollo de un brote producido por esta bacteria en humanos (Harvey et al., 2017; Ung et al., 2019). En los últimos años a nivel mundial se ha visto un incremento en la incidencia de esta infección vinculada al consumo de carne, principalmente carne picada (Harvey et al., 2017). Las ETAs en Uruguay constituyen un problema grave y creciente para la salud pública reportándose 47 brotes en el año 2016, siendo la salmonelosis la enfermedad con el mayor número de diagnósticos dentro de estas, con 18 brotes en ese mismo año (MSP, 2017).

2.3- Identificación de *Salmonella*

Confirmación molecular del género *Salmonella*

El gen *invA* codifica una proteína importante para la invasión intestinal durante la infección por parte de *Salmonella* (Chiu & Ou, 1996; Chacón et al., 2010). Está localizado en la isla de patogenicidad 1 (SPI- 1), específico de *Salmonella* spp. y se encuentra presente tanto en *S. enterica* como en *S. bongori*, La detección de un gen de virulencia como el gen *invA* el cual es específico y sensible para detectar miembros de este género sumado a su alta reproducibilidad, lo hace ideal para diferenciar *Salmonella* spp. de otras bacterias. Se utiliza también en aguas, alimentos (Karmi, 2013; Yanestria et al., 2019).

Serotipificación de *Salmonella enterica*: métodos clásico y molecular

Existen en la actualidad una variedad de técnicas tanto convencionales (a partir de antisueros) como moleculares que permiten tipificar las variantes de *Salmonella* con dicho fin.

La serotipificación tradicional se basa en la aglutinación de células bacterianas enfrentadas a un antisuero específico. Es una prueba sencilla que puede realizarse a partir de cultivos de bacterias vivas o muertas, dando una reacción clara y es considerado el método *gold standard* (Wattiau et al. 2011). Son más frecuentes utilizadas las pruebas de aglutinación en lámina y en tubo, pudiendo ser obtenidos los antisueros a nivel comercial (Wattiau et al., 2011; Bisio, 2017). Por otra parte, es un método costoso necesitándose 150 antisueros específicos además de personal capacitado para su realización, debido a ello no todos los laboratorios pueden llevarla a cabo. En muchos países los laboratorios privados envían los aislamientos obtenidos a un laboratorio de referencia para este fin (Herrera-Leon et al., 2007; Wattiau et al., 2011; Bisio, 2017). Por lo general requiere un mínimo de 3 días dependiendo de la complejidad de la serovariedad, en algunos casos ocurre la pérdida de la expresión antigénica limitando la serotipificación. Pueden producirse reacciones positivas falsas

como resultado de una aglutinación débil e inespecífica (Bisio, 2017; Silva et al., 2017).

Los métodos moleculares surgieron como una alternativa viable para realizar la serotipificación de *Salmonella* (Wattiau et al., 2011). Presentan como ventaja ser más rápidas, confiables, reproducibles resultando más económicas comparado con el método tradicional. Se basan en la secuencia de ADN, dirigido a la identificación de genes que codifican antígenos somáticos 'O' y flagelares 'H' siguiendo la gran mayoría el criterio de clasificación propuesto por White-Kauffman (Herrera-Leo et al., 2004; Herrera-Leo et al., 2007; Wattiau et al., 2011). Se puede encontrar una gran variedad de técnicas propuestas, estando dentro de las más destacadas la Multilocus sequences typing (MLST); secuenciación de gen *fliC* (gen flagelar fase 1) y PCR multiplex de antígenos somáticos y flagelares (Wattiau et al., 2011; Silva et al., 2017). Esta últimas actúan principalmente sobre los genes *rf6* (*wzx*, *tyv*) para 5 tipo de antígenos somáticos O:4 (grupo B), O:7 (grupo C1), O:6,8 (grupo C2), O:9 (grupo 9), O:3 (grupo E), *fliC* (H1), 8 tipos de antígenos flagelar I (i,r,l,v,e,h,z10,b,d y complejo G); en tanto *fliB* (gen flagelar fase 2) codifica (H2) y 7 tipos de antígeno flagelar II (1,2;1,5;1,6;1,7;l,w; e,n,x;e,n,z15)(Echeita et al., 2002; Herrera-Leo et al., 2004; Herrera-Leo et al., 2007; Bisio, 2017; Silva et al., 2017). Dada la importancia de *Salmonella* como patógeno responsable de enfermedad tanto en bovinos como en humanos, la identificación molecular de los serovares es indispensable para la investigación epidemiológica e instaurar medidas oportunas de control con el fin de disminuir la incidencia de estas.

2.4- Resistencia a los antimicrobianos

Se estima que el consumo de antibióticos a nivel mundial en 2010 era aproximadamente de 63.151 toneladas esperándose para el 2023 un aumento del 67% (Ma et al., 2019). El uso inapropiado de estos agentes antimicrobianos para tratamiento de infecciones humanas y animales, así como agentes promotores del crecimiento en sistemas de producción animal, ha llevado a la aparición, selección, dispersión y persistencia de bacterias resistentes a diversos antibióticos (Aarestrup, 2005). La creciente aparición de RAM en numerosos aislamientos bacterianos, ha despertado la preocupación debido a que estos patógenos son más virulentos y provocan fracasos en los tratamientos, alta tasa de mortalidad y aumento del período de hospitalización. En Estados Unidos se reportan más de 2 millones de personas que sufren infecciones por microorganismos resistentes y 23.000 mueren a causa de estos (Ma et al., 2019). La demanda de alimentos seguros, contribuye a la carga económica de los países industrializados y subdesarrollados a través de los costos asociados con la vigilancia, la prevención y el tratamiento de la enfermedad (Crump et al., 2004; Scallan et al., 2011).

En países desarrollados del 50% al 80% del uso de antibióticos se da en la producción de animales para alimentos (Ma et al., 2019). Los bovinos son una de las fuentes de contaminación y difusión cada vez más importante en relación a la RAM (Alexander et al., 2009). Dentro de las bacterias de mayor importancia con respecto a la RAM se

encuentra *Salmonella* por la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). En el tratamiento de infecciones invasivas de *Salmonella*, que comúnmente ocurren en niños, se sustenta principalmente en el uso de cefalosporinas de amplio espectro (Sugawara et al., 2011). La identificación de los reservorios de patógenos resistentes a nivel de los predios agropecuarios es un primer paso para la implementación de programas de control (Mather et al., 2011; Jajere et al., 2019).

En Uruguay, en 2017, se lanzó el Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana, el cual tiene como objetivo prevenir las enfermedades e impedir la muerte de humanos y animales causada por infecciones producidas por microorganismos resistentes, dentro del concepto “Una Salud”. En este marco se busca priorizar el desarrollo de la vigilancia, la investigación nacional en RAM, el uso racional de los antimicrobianos, generar conciencia sobre la misma y promover las acciones para contrarrestarla (MGAP, 2017). Es importante el diseño de programas de inocuidad alimentaria, que contemplen el control del consumo mundial de antibióticos en animales destinados a la elaboración de alimentos (Van Boeckel et al., 2017).

En este sentido un estudio realizado por Casaux et al. (2019), describe aislamientos obtenidos en establecimientos lecheros con múltiple resistencia a antibióticos (al menos a 3 familias de estos). El hallazgo más frecuente fue la resistencia a tetraciclinas, estreptomicina y ampicilina. En nuestro país se ha descrito resistencia mediada por BLEE de varios tipos en enterobacterias. Dentro de estas se encuentra el grupo CTX-M (CTX-M-2, CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-8, CTX-M-14). Alguna de estas se ha encontrado en *Salmonella*, siendo CTX-M-2 la más frecuente tanto en Uruguay como países de la región como es el caso de Argentina (Vignoli et al., 2006; Villegas et al., 2008; Bado et al., 2012). Suponiendo un gran riesgo no solo por su potencial zoonótico sino por la posibilidad de transferir dicha resistencia a otros géneros bacterianos (García et al., 2010).

2.5- Caracterización de la sensibilidad antimicrobiana

La detección de sensibilidad a antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínicos. Se clasifican en métodos cuantitativos y cualitativos, permitiendo las primeras determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) o la concentración bactericida mínima (CBM). La CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo o en agar. Los métodos cualitativos generalmente están representados por disco difusión en agar (Kirby Bauer) que permite calificar directamente un microorganismo en sensible o resistente (Canton, 2010; Tascini et al., 2016). Es uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria de los laboratorios, siendo económico y fácil de realizar. Los criterios de los puntos críticos que se utilizan para ambos métodos son determinados por el European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en los Estados Unidos (Canton, 2010; Tascini et al., 2016).

Estas técnicas no sólo son un conjunto de metodologías para detectar la sensibilidad antimicrobiana, sino que en base a sus resultados es posible la elección de una

terapéutica adecuada a cierto microorganismo, generar una base de datos para elegir un antibiótico para tratamiento empírico, desarrollo de políticas de uso de los mismos, vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia y detectar aparición precoz de cepas multiresistentes tanto a nivel hospitalario como comunitario (Canton, 2010; Tascini et al., 2016).

2.6- Resistencia por BLEE

A nivel mundial los antibióticos principalmente utilizados en el tratamiento de infecciones graves por *S. enterica* tanto en salud pública como en medicina veterinaria son los betalactámicos: amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Call et al., 2008). Estas últimas han sido catalogadas por la OMS como de importancia crítica en salud humana (Sato et al., 2014).

El mecanismo de resistencia más frecuente en enterobacterias a estos antibióticos es el enzimático, dado por producción de betalactamasas, enzimas que actúan hidrolizando el anillo betalactámico. Los genes que codifican estas enzimas pueden ser cromosomales o plasmídicos (Martínez-Martínez y Calvo, 2010). Están clasificados según dos esquemas de acuerdo a Ambler (Ambler et al., 1991), y Bush-Jacoby-Medeiros (Bush, Jacoby, & Medeiros, 1995) estando correlacionados. Según Amber se clasifican de la A a la D en base a secuencias de aminoácidos en su estructura, en tanto Bush-Jacoby-Medeiros las clasifica en grupos funcionales asentada en la inhibición de clases específicas y en las propiedades de inactivación de los inhibidores de betalactamasas. Dentro de clase A (serina-penicilinasas) y C (serina-cefalosporinasas) de la clasificación de Ambler se encuentran las betalactamasas de mayor importancia (Vila y Marco, 2010; Bialvaei et al., 2016).

El uso en exceso de los antibióticos durante las últimas décadas ha ayudado a la aparición y propagación de mecanismos de resistencia más eficientes como es el caso del mediado por enzimas BLEE, derivadas de la mutación de la betalactamasas clásicas del grupo 2b (Vila y Marco, 2010). Estas enzimas actúan frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, encontrándose en este grupo CTX-M, TEM, SHV, OXA y carbapenemasas (Suárez y Gudiol, 2009; Bialvaei et al., 2016). Se han descrito en varias enterobacterias entre ellas *Salmonella*, *E. coli*, *Klebsiella* de diversos orígenes como humanos, animales ambientales (Lee et al., 2020). En general su propagación ha sido mayor en países de menores recursos. En este sentido, en Suecia se ha encontrado un 3% de bacterias productoras de BLEE en comparación con > 25% en Grecia, Turquía y Portugal o > 30% América del Sur (Villegas et al., 2008). En un estudio realizado en Suiza en materia fecal de diversas especies se encontró una prevalencia de bacterias productoras de BLEE de 63,4% en pollos parrilleros, 15,3 % cerdos, 13,7% bovinos y 8,6% ovinos, entre las variantes más destacadas se encontraron 85,7% CTX-M1, 5,5% SVH y 2,2% TEM (Geser et al., 2012). Otras fuentes como el suelo 18,3% (22/120) y en recursos hídricos 5 % (6/116) de predios de producción bovina (Lee et al., 2020). En bovinos se ha descrito en más

de 39 países con mayor concentración en Europa y Asia destacando como variantes más comunes CTX-M 1, CTX-M 14 y CTX-M 15 (Palmeira y Neto-Ferreira, 2020).

2.6.1- BLEE tipo TEM y SHV

Las BLEE tipo TEM y SHV son habitualmente encontradas en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* codificadas en gran variedad de plásmidos conjugados, lo que facilita la diseminación no solo en bacterias de la misma especie, sino en otros géneros bacterianos (Urquiza et al., 2018). Las BLEE de tipo TEM (Temoniera) se derivaron de los grupos TEM-1 y TEM-2 se reportan más de 200 enzimas, las más comunes descripta en Estados Unidos, Europa y América del Sur son TEM-10 y TEM-26 (Villegas et al., 2008). Las de tipo SHV (Sulfhidrilo Variable) derivaron del SHV-1, describiéndose actualmente 189 tipos, siendo las más frecuentes para esta variante SHV-5 y SHV-12 (García et al., 2010; Villegas et al., 2008). Estas enzimas hidrolizan antibióticos betalactámicos de espectro extendido y son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam (García et al., 2010; Urquiza et al., 2018).

2.6.2 BLEE tipo CTX-M

Las CTX-M (cefotaximasas) están asociadas a una gran cantidad de elementos móviles que han propiciado una diseminación rápida y eficiente (Canton et al., 2012). Son las betalactamasas de mayor prevalencia nivel mundial en la actualidad, y de carácter endémico en una amplia área geográfica, que incluye América, Asia y Europa. Se han encontrado tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad (Torres y Zarazaga, 2007; Plassard et al., 2020). El linaje de CTX-M es muy heterogéneo, incluye al menos seis grupos de enzimas CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 y KLUC (Wong et al., 2014; Seo & Lee, 2020). Cuenta con 172 variantes enzimáticas, la mayoría de estas se ubican en los grupos 1 y 9 dentro de éstas la CTX-M- 15 y CTX-M-14 son las más importantes invadiendo humanos, animales y medio ambiente. Sin embargo, en algunos lugares el grupo CTX-M-2 sigue siendo endémico (Canton et al., 2012; Bialvaei et al., 2016; Seo & Lee, 2020). El nombre CTX-M deriva por su acción frente a cefotaxima, es la característica de esta enzima y actúan con menos eficacia sobre ceftazidima. Recientemente se reportó que más del 60 % de las variantes de CTX-M confieren resistencia simultáneamente para ambos antibióticos. Estas enzimas se inhiben mejor con el tazobactam que con el ácido clavulánico (Canton et al., 2012).

2.7- *Salmonella* Typhimurium DT104

La *S. Typhimurium* fagotipo DT104 es una variante epidémica de *S. Typhimurium* con un amplio patrón de resistencia a los antibióticos como la ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina (Besser et al., 2000; Yukawa et al., 2015). La resistencia a ciprofloxacina en esta variante hace particularmente difícil su control (Helms et al., 2005). Las cepas DT104 tienen una

amplia diversidad de hospederos, son patogénicas en humanos y animales de producción en particular el ganado bovino con un marcado aumento de casos en éstos desde la década del 90 (Besser et al., 2000; Helms et al., 2005). En la actualidad representa el 50% de todos los casos de *S. Typhimurium* en muchos países del mundo (Parker et al., 2021). El consumo de alimentos contaminados (carne bovina, cerdo, pollo, leche cruda), así como el contacto de animales infectados (ganado y animales de compañía) son la principal fuente de infección en el hombre (Murphy et al., 2001). Se considera a los bovinos, un importante reservorio de *S. Typhimurium* DT 104, aunque afecta a otras especies como gatos, caballos, cerdos, ovejas (Helms et al., 2005; Leekitcharoenphon et al., 2016). Asimismo, en EEUU se ha reportado infecciones en mamíferos y aves silvestres (Threlfall, 2000; Yukawa et al., 2015). Las tasas de mortalidad y hospitalizaciones en humanos son más altas con la variante DT104 que otros con otras especies *Salmonella* (Murphy et al., 2001).

3- CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Uruguay es un país exportador de alimentos representando un importante ingreso económico para el mismo. Si bien existen controles en los productos a exportar en Uruguay debido a normativas de organismos internacionales y mercados, que exigen la ausencia de *Salmonella*, hay muy poca información sobre la enfermedad. Los brotes de ETAs causadas por este agente son la principal causa en Uruguay de este tipo de enfermedad, coincidiendo con lo que pasa en el mundo. En Estados Unidos se reportan 400 muertes al año de personas a causa de *Salmonella enterica* (Alexander et al., 2009).

Otro desafío en la actualidad es la resistencia antimicrobiana donde a nivel mundial existen una necesidad creciente sobre un manejo adecuado de estos productos en salud humana y animal, junto con una mayor demanda de carne de calidad producida sin antibióticos. La resistencia a los antimicrobianos amenaza también derrumbar décadas de crecimiento en tecnologías empleadas para la salud humana, proyectándose millones de muertes debido al aumento de la RAM en las décadas venideras (Daniel et al., 2017).

En tanto en salud animal la baja en productividad debido a mayor prevalencia de enfermedades sin tratamiento, como restricciones impuestas a nivel comercial con reducción de las exportaciones, repercuten en forma negativa en el desarrollo de la producción ganadera. Se ha estimado una caída de la producción hasta un 11% en países sub- desarrollo para el año 2050 por esta causa (World Bank Group, 2017).

El fortalecimiento del diagnóstico junto al monitoreo de la RAM de *Salmonella enterica* a nivel de predios agropecuarios es un primer paso para la implementación de programas de control que nos aseguren inocuidad alimentaria, tanto como requisito de acceso a los mercados internacionales, y la garantía sanitaria para los productos importados destinados al consumo local (Tafur, 2009).

4- HIPÓTESIS

Salmonella enterica con resistencia mediada por betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y *S. Typhimurium* DT104, están presentes como agentes causales en brotes de salmonelosis en bovinos del Uruguay.

5- OBJETIVOS

5.1- Objetivo general:

Identificación molecular, caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos a partir de casos bovinos registrados en el Laboratorio Regional Noroeste, DILAVE “Miguel C. Rubino” Paysandú de Uruguay.

5.2- Objetivos específicos

- Detección genes específicos para la identificación de *Salmonella enterica* en los aislamientos obtenidos en bovinos.
- Estudio del perfil fenotípico de resistencia de los aislamientos de *Salmonella* entérica.
- Clasificar en serotipos los aislamientos de *Salmonella enterica* obtenidos.
- Detección de genes de resistencia para betalactamasas de espectro extendido
- Detección genotípica de la presencia de aislamientos de *Salmonella* Typhimurium DT104.

6- MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio Regional Noroeste en la sección de Bacteriología perteneciente a la División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-MGAP (DILAVE Paysandú), ubicado en la ciudad de Paysandú. Se utilizó para tales fines, un banco de 107 aislamientos de *Salmonella enterica*; 88 aislamientos obtenidos en el laboratorio Regional Noroeste provenientes de casos clínicos bovinos llegados al mismo en el periodo comprendido 2014-2021 y los 19 restantes fueron enviados por DILAVE Montevideo para su tipificación entre 2018-2021.

Los aislamientos obtenidos pertenecientes a 91 animales (80 terneros, 8 vacas y 3 fetos) de 64 focos. Desarrollados en 14 Departamentos, de los cuales el 31,3% fueron del departamento Paysandú y el 68.7% repartidos en los 13 departamentos restantes (Cuadro I). El 91,6 % de los aislamientos derivaron de muestras de órganos (hígado, pulmón, ganglio mesentérico, bazo, intestino delgado), 8,4 % de materia fecal.

Cuadro I: Números de focos *Salmonella enterica* distribuidos por Departamentos.

Departamentos	Focos	%
Paysandú	20	31,3
Durazno	9	14,1
Florida	6	9,4
Rio Negro	5	7,8
San José	5	7,8
Soriano	5	7,8
Colonia	4	6,3
Flores	2	3,1
Treinta y tres	2	3,1
Salto	2	3,1
Tacuarembó	1	1,6
Cerro Largo	1	1,6
Artigas	1	1,6
Canelones	1	1,6

6.1- Serotipificación

En DILAVE Paysandú se le realizó a cada aislamiento la serotipificación de manera convencional por el método en porta objetos. Utilizando antisueros monovalentes Vision™ (Pro-Lab Diagnostics™, EEUU) para antígenos somáticos (O), y flagelares (H1 y H2) para determinar los serotipos *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Dublin y *Salmonella* Enteritidis. Tanto el procedimiento como la interpretación de resultados se hicieron de acuerdo a las especificaciones técnicas del fabricante. Los aislamientos que no pudieron ser tipificados dentro de estos tres serotipos fueron enviados al área de Bacteriología del Instituto de Higiene para la caracterización correspondiente. La asignación de los serovares se estableció siguiendo el esquema White-Kauffman (Grimont & Weill, 2008).

6.2- Caracterización fenotípica de la sensibilidad a antibióticos

La susceptibilidad *in vitro* a agentes antimicrobianos de *Salmonella enterica* se determinó a través de los métodos de disco difusión agar (DDA) o método de Kirby-Bauer y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Para realizar estos ensayos se utilizaron cultivos frescos (24hs/37°C) en agar sangre ovina al 5% (CLSI, 2022).

6.2.1-Disco Difusión Agar

El método de DDA o Kirby-Bauer fue realizado de acuerdo a las recomendaciones y criterios del CLSI (2022), utilizando placas de agar Mueller-Hinton (Oxoid, England) y los siguientes discos de antibióticos (Oxoid, England): ampicilina, 10 µg; amoxicilina + ácido clavulánico, 30 µg; cefotaxima, 30 µg; ceftazidima, 30 µg; ac. nalidíxico, 30µg; enrofloxacina, 5 µg, ciprofloxacina 5µg; gentamicina, 10µg; akamicina, 30 µg; estreptomycin,10 µg; kanamicina, 30 µg; tetraciclina, 30 µg; sulfametoxazol + trimetoprima, 25 µg; cloranfenicol, 30 µg; fosfomicina, 50 µg. Mientras que la cepa de *E. coli* ATCC 35218 fue incluida como control de calidad. Los aislamientos fueron categorizados como susceptibles, con susceptibilidad intermedia y resistentes de acuerdo a los estándares del EUCAST (2022) y CLSI (2018).

6.2.2-Microdilución en Placa

Para determinar la CIM fue utilizado un kit de microdilución en placa disponible comercialmente Trek Diagnostic Systems Ltd (East Grinstead, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicha placa comercial (ARGNF) de microdilución contenía los siguientes antibióticos AMP- ampicilina, FOT- cefotaxima, A/S2 -ampicilina/sulbactam 2:1, P/T4- piperacilina/tazobactam constant 4, FEP -cefepima, MERO- meropenem, IMI- imipenem, AMI –amikacina, LEVO – levofloxacin, CIP- ciprofloxacina, MIN- minociclina, TGC- tigeciclina, FUR-

cefuroxima, ETP- ertapenem, COL- colistina, FOX- cefoxitina, NIT- nitrofurantoína, FOS+- fosfomicina+glucosa-6-fosfato, SXT- trimetoprim/sulfametoxazol, CHL- cloranfenicol, AUG2- amoxicilina/ácido clavulánico 2:1 , NAL- ácido nalidíxico. Los aislamientos fueron categorizados como susceptibles, susceptibilidad intermedia y resistentes de acuerdo a la CIM obtenida según los criterios de EUCAST, (2022) y CLSI, (2018).

6.3- Detección fenotípica de BLEE tipo CTX

Aquellos aislamientos que presentaron susceptibilidad disminuida a cefotaxima y ceftazidime en disco se incluyeron en una prueba para determinar la presencia de enzimas BLEE por el método de Jarlier (Garrec et al., 2011). Se preparó un inóculo con una turbidez equivalente 0,5 de la escala de Mc Farland y se sembró en placas de agar Mueller Hinton (Oxoid, England). En el centro de dichas placas se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/10 µg) y a 25 mm de distancia, se colocaron discos de ceftazidima (CAZ) (30 µg/ dL), cefotaxima (CTX) (30 µg) y cefepima (FEP) (30 µg). La presencia de enzimas BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor (ácido clavulánico) y los discos de las cefalosporinas (figura 1). La distorsión de los halos de inhibición que se produce entre los discos de CTX, CAZ y FEP con el disco central de AMC confirmaron la presencia de estas enzimas (Calvo et al., 2011; Lezameta et al., 2010).

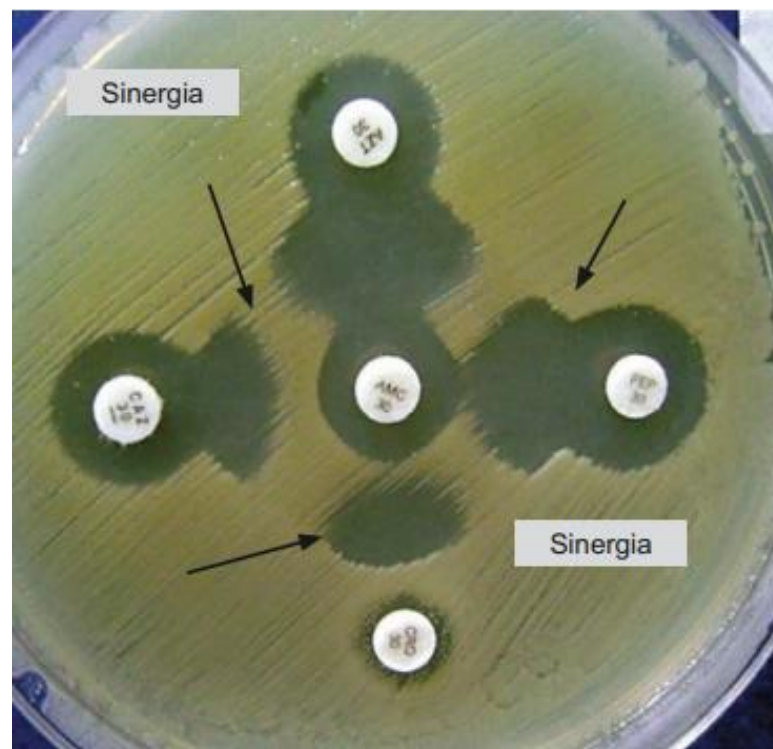


Figura 1: Método del doble disco para la detección de BLEE. Observándose el efecto sinérgico (halos de inhibición como indica la flecha) que se produce entre los discos de ceftriaxona (CRO), cefepime (FEP), ceftazidima (CAZ), y aztreonam (AZM), con el disco de amoxicilina, ácido clavulánico (AMC) confirmando la presencia de BLEE (Extraído de Lezameta et al., 2010).

6.3.1- Criterios para categorizar multirresistencia

Se siguió el criterio descrito por Magiorakos et al. (2012), que considera a un microorganismo multirresistente (MDR) cuando es no susceptible a uno o más antibióticos de tres o más categorías.

6.4- Extracción de ADN

La extracción de ADN de los 107 aislamientos se realizó a partir de las colonias aisladas en agar sangre ovina al 5%. Se tomaron 3-5 colonias con ansa descartables y se suspendieron en 150 µL de agua ultra pura o Buffer TEM. Los mismos se homogeneizaron en vortex. Luego la suspensión bacteriana se llevó a ebullición por 5 min, prontamente se centrifugaron por 15 min a 10.000 rpm, recuperándose el sobrenadante. El mismo se mantuvo a -20 °C, hasta su utilización.

6.5- Identificación de *Salmonella*

6.5.1-Detección del gen *invA*

Con el fin de confirmar que dichos aislamientos pertenecían al género *Salmonella* se utilizaron los cebadores descritos en el cuadro II, según la metodología propuesta por Yukawa et al. (2015). Se agregó 4,8 ng/µl de ADN a una mezcla de reacción de 20 µl, que contenía Buffer 1X, 1 µM de cada primer, dNTPs 200 µM, MgCl₂ 2mM y 0.5 U Taq polimerasa (Thermo Scientific™, Estados Unidos). Las condiciones empleadas para el termociclado fueron: Desnaturalización inicial = 95°C por 1min; Ciclado= 30 ciclos: 94°C 30seg -- 55° 30seg -- 72°C 1min; Extension final = 72°C por 3min. Se empleó un termociclador 9902 Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied (Biosystems, Singapur).

Cuadro II : Cebadores utilizados detección de genes *INVA* y *ST 104*

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Ta
Inv-A F	TTGTTACGGCTATTTTGACCA	511pb
Inv-A R	CTGACTGCTACCTTGCTGATG	
ST104F	TACCGCCATTCGCATAAACG	312pb
ST104R	CAGAGGTTGGTATTGTAGCG	

Ta: tamaño del amplicón

6.5.2-PCR multiplex antígenos somáticos (genes *tyvD* y *wzx*)

La serotipificación molecular de los aislamientos de *Salmonella enterica* se llevó a cabo mediante la realización de tres PCR multiplex, una para antígenos somáticos y

dos para antígenos flagelares (H1 y H2). La detección de antígenos somáticos se realizó siguiendo la metodología descrita por Herrera León et al. (2007). Se utilizó un volumen final de 20 µL. Se agregó agua ultrapura 7,8µL, Buffer 1X, MgCl₂ 3mM, dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de cada Primers (cuadro III), Taq polimerasa 5 U, 4,8 ng/µl de ADN. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: Desnaturalización inicial = 95°C por 5min; Ciclado= 30 ciclos: 94°C 30seg -- 56° 45seg -- 72°C 30seg; Extension final = 72°C por 7min

Cuadro III: Cebadores para detección de antígenos somáticos *Salmonella enterica*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Ta
F-tyvD	GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT	614
R-tyvD	TAGCAAAGTGTCTCCCACCATAC	pb
F-wzxB	GGCATATATTTCTGTATTTCGC	229
R-wzxB	GCCTTAATTAAGTAAGTTAGTGGAAGC	pb
F-wzxC1	CAGTAGTCCGTAAAATACAGGGTGG	483
R-wzxC1	GGGGCTATAAATACTGTGTAAATTCC	pb
F-wzxC2	ACTGAAGGTGGTATTTTCATGGG	153
R-wzxC2	AAGACATCCCTAACTGCCCTGC	pb
F-wzxE1	TAAAGTATATGGTGCTGATTTAACC	344
R-wzxE1	GTAAAATGACAGATTGAGCAGAG	pb

Ta: tamaño del amplicón

6.5.3-PCR multiplex antígenos flagelares fase 1

El procedimiento para la detección de antígenos flagelares fase 1, se realizó siguiendo la metodología descrita por Herrera León et al. (2004). Utilizando un volumen final de 20 µL. Se agregó Agua ultra pura 7,4µL, Buffer 1X , MgCl₂ 2 mM , dNTPs 0,2 mM, de cada Primers Sense-60 0,2 µM , Antisense-i 0,2 µM , Antisense-z10 0,2 µM, Antisense-lv 0,2 µM, Antisense-r 0,2 µM, Forward-Sdf-l 0,2 µM, Reverse-Sdf-l 0,2 µM, Antisense-b 0,3 µM, Antisense-eh 0,3 µM , Forward-d 0,3 µM, Reverse-d 0,3 µM, Forward-G 0,3 µM, Reverse-G 0,3 µM (cuadro IV), Taq polimerasa 5 U, 4,8 ng/µl de ADN. Las condiciones empleadas para el termociclado fueron: Desnaturalización inicial = 95°C por 5min; Ciclado= 30 ciclos: 94°C 40seg -- 58° 30seg -- 72°C 30seg; Extension final = 72°C por 7min.

Cuadro IV : Cebadores para detección de antígenos flagelares fase 1 de *Salmonella enterica*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Ta
Sense-60*	GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG	250 pb
Antisense-i	ATAGCCATCTTTACCAGTTCC	447 pb
Antisense-z10	CGTCGCAGCTTCTGCAACC	167 pb
Antisense-b	CGCACCAGTCYWACCTAAGGCGG	200 pb
Antisense-eh	AACGAAAGCGTAGCAGACAAG	326 pb
Antisense-lv	CCTGTCACCTTCGTGGTTAT	281 pb
Antisense-r	AAGTGACTTTTCCATCGGCTG	100 pb
Forward-d	CCCGAAAGAAACTGCTGTAACCG	500 pb
Reverse-d	TGGATATCAGTATTGCTCTGGGC	500 pb
Forward-G	GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG	500 pb
Reverse-G	AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG	500 pb
Forward-Sdf-1	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG	333 pb

Ta: tamaño del amplicón

6.5.4-PCR multiplex antígenos flagelares fase 2

Para las PCR multiplex de antígenos flagelares fase 2, se utilizó la metodología descrita por Herrera León et al. (2007) partiendo de un volumen final de 20 µL. Se agregó Agua UP 9µL, Buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, de cada Primers Sense-F1mod 0,3 µM, Antisense-R5mod 0,2 µM, Antisense-R6 0,2 µM, Antisense-R7 0,2 µM, Antisense R1mod 0,3 µM, Sense-Fw 0,2 µM, Antisense-Rw 0,2 µM, Sense-Fe 0,3 µM, Antisense-Rx 0,2 µM, Antisense-Rz15 0,3 µM (Cuadro V), Taq polimerasa 5 U, 4,8 ng/µl de ADN. Condiciones de amplificación son las mismas que las descritas para los antígenos H1.

Cuadro V: Cebadores para detección de antígenos flagelares fase 2 de *Salmonella enterica*

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Ta
Sense-F1mod	CTTATGCCRATAATGGTACTACTG	
Antisense-R54mod	GGTTACAGVAGCCGTACCAG	98pb
Antisense-R6	CTCCTGTACTTCTGTTTTGGTTGTA	298pb
Antisense-R7	TAATCGCCATTTTTGTTCGAG	190pb
Antisense-R1mod	TTGACCAAYKYMGCSCAT	388pb
Sense-Fw	GTGGGGCAACMCTCAATACTG	240pb
Antisense-Rw	CCTGCCACTTTCGTGGTTGC	
Sense-Fe	GGCAACCCGACAGTAACTGGCGATAC	
Antisense-Rx	CCATCCTTAAAGGATACGGC	54
Antisense-Rz15	ATCAACGGTAACTTCATATTTG	134

Ta: tamaño del amplicón

6.6- Identificación de genes asociados a la resistencia a antibióticos

6.6.1-Detección de genes de resistencia a los betalactámicos mediado por enzimas tipo TEM, SHV, CTX-M

La presencia de mecanismos de resistencia por enzimas tipo BLEE fue evaluado buscando los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* los cuales codifican las enzimas TEM, SHV y CTX-M respectivamente. Se utilizaron 0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 0,4 μM de cada cebador, 4,8 ng/μl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de buffer de la enzima. Termociclado; 5 min a 95 °C, 48 ° [45 s a 94 °C, 45 s a temp. annealing (Cuadro VI), 2 min a 72 °C] x 35 52 °C, extensión 7 min a 72 °C. Las mismas se hicieron siguiendo la metodología descrita por Umpierrez. (2017).

Cuadro VI: Cebadores para detección de genes de resistencia β-lactamasas.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Ta	Taa
OT4	ATGAGTATTCAAACCTITCCG	900pb	52°C
OT4	CCACTGCTTAATCAGTGAGG		
PAN CTX-M-F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	543pb	59°C
PAN CTX-M-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
SHV-A	ATGATGAGCACCTTTAAAGTA	620pb	52°C
SHV-B	ATTCGCTCGGCCATGCTCGC		

Ta: tamaño del amplicón, Taa: temperatura de alineación

6.7-PCR para la detección de Salmonella Typhimurium DT104

Para la detección de *S. Typhimurium* fago tipo DT 104 dentro de los aislamientos tipificados como *S. Typhimurium*, se realizó una PCR a tiempo final, utilizando primers específicos *ST104* (Cuadro VI), diseñados para que amplifique un fragmento de 312pb dentro de la secuencia *ST104* usados para detección de estas variantes. El procedimiento se realizó siguiendo la metodología descrita por Yukawa et al. (2015), las condiciones de la Mix y Termociclado fueron descritas anteriormente en el punto 6.5.1 para la identificación del gen *invA*, debido a que son las mismas para ambos PCR.

6.8- Visualización de productos PCR

Para visualizar los productos de amplificación de las PCR realizadas (puntos 6.5.1, 6.5.2, 6.5.3, 6.5.4, 6.6.1 y 6.7) se utilizó electroforesis en gel de agarosa. Como buffer de corrida se utilizó TAE (1X). El gel se preparó con una concentración de agarosa del 1,5%, teñidos con Good View Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Gentech Co. Lts., China) la corrida fue durante 45 min- 1h en un trans-iluminador de luz UV (Enduro GDS- 1302 Lab net International, Inc. EE. UU).

7. RESULTADOS

7.1- Confirmación de género *Salmonella* a través del gen *invA*

Los 107 aislamientos amplificaron una banda de 511 pb resultando positivos al gen *invA*, confirmando el género *Salmonella* de los mismos (figura 2).

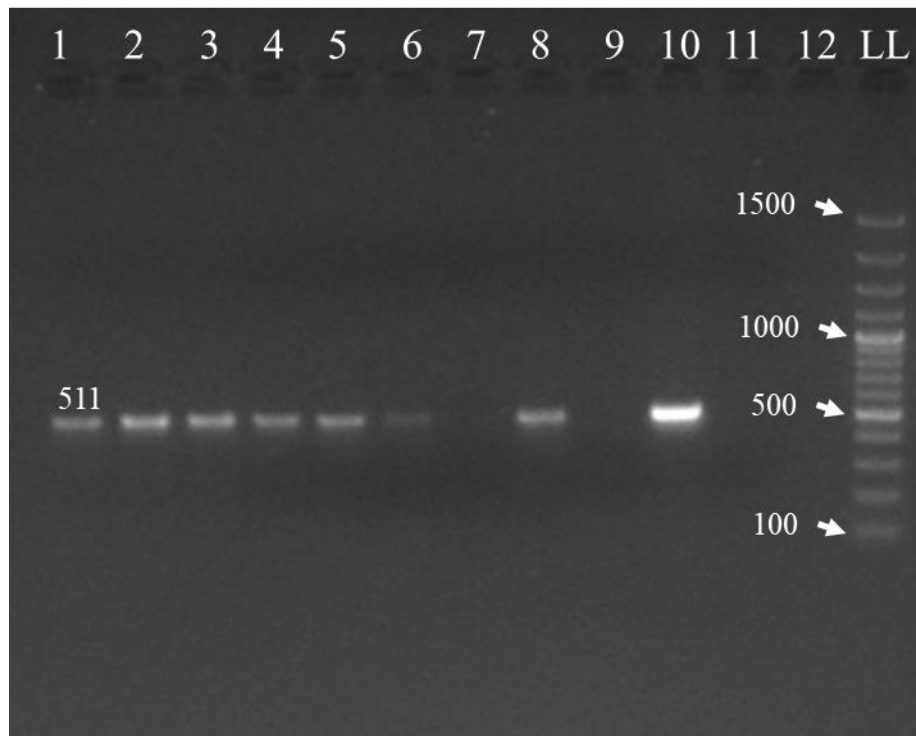


Figura 2: Confirmación genética de aislamientos identificados fenotípicamente como *Salmonella* spp., por amplificación del gen *INVA* a través de PCR a tiempo final. Carril 1): *Salmonella* Typhimurium (control positivo); carriles 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 aislamientos identificados fenotípicamente como *Salmonella* spp. positivos al gen *INVA*. Carriles 7, 9, 11 aislamientos identificados fenotípicamente como *Salmonella* spp. negativos al gen *INVA*. Carril 12 control negativo. Ladder 100~1200 pb (HyperLaddertm 100bp, Bioline).

7.2- Serotipificación de los aislamientos

Del total de 107 aislamientos, 99 fueron identificados por la combinación de tres PCR multiplex (Figura 3, 4, 5 y 6) y solamente en 8 no se pudo llegar a la identificación de serotipos mediante esta técnica. Para la misma en estos aislamientos se utilizó la técnica de antisuero monovalente en porta objetos identificando *S. Montevideo* y *S. Anatum*, *S. Typhimurium* (Anexo I). Dentro de los 6 serovares identificados *S. Typhimurium* y *S. Dublín* representaron el 84,1 % de los mismos (cuadro VII).

Cuadro VII: Serovares de *Salmonella enterica* obtenidos en los 107 aislamientos.

Serogrupos	Serovares	N.º de cepas
B	<i>Salmonella</i> Typhimurium	69
D	<i>Salmonella</i> Dublin	21
C1	<i>Salmonella</i> Montevideo	6
E1	<i>Salmonella</i> Anatum	6
D	<i>Salmonella</i> Enteritidis	3
E1	<i>Salmonella</i> Give	2

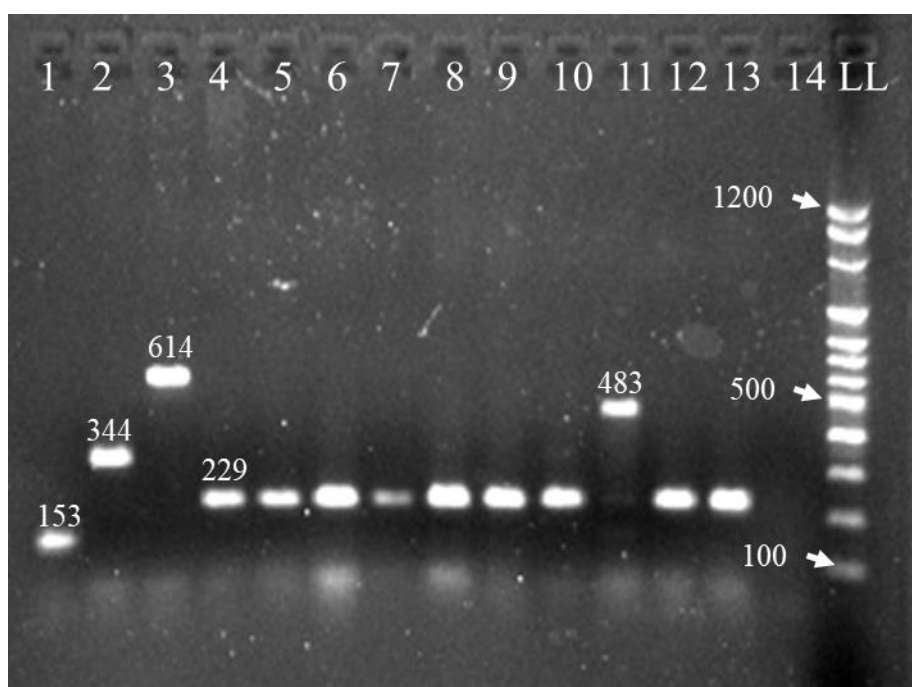


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR Multiplex Antígenos Somáticos: Carril 1) *S. Newport* (O:6,8); Carril 2) - *S. Anatum* (O:3,10); Carril 3) *S. Dublin* (O:9); Carril 4) *S. Typhimurium* (O:4); del carril 5 al 10 muestras positivas a (O:4); Carril 11) muestra positiva a (O:7); Carril 12 y 13 muestras positivas a (O:4); Carril 14) control negativo; 15) Ladder 100~1200 pb. (HyperLadder™ 100bp, Bioline).

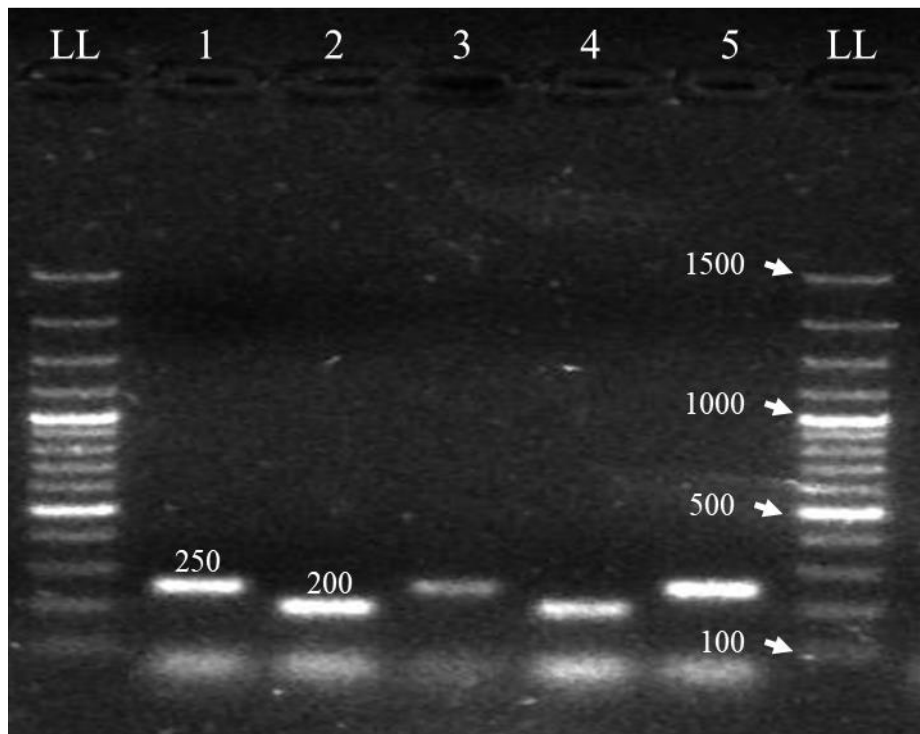


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR Multiplex Antígenos flagelares1 Ladder 100~1200 pb (HyperLadder™ 100bp, Bioline): Carril 1) *S. Typhimurium* (H: i); Carril 2) *S. Anatum* (H: e, h); Carril 3) muestras (H:i) positiva; Carril 4) muestras positiva (H:e,h); Carril 5) muestra positiva (H:i).

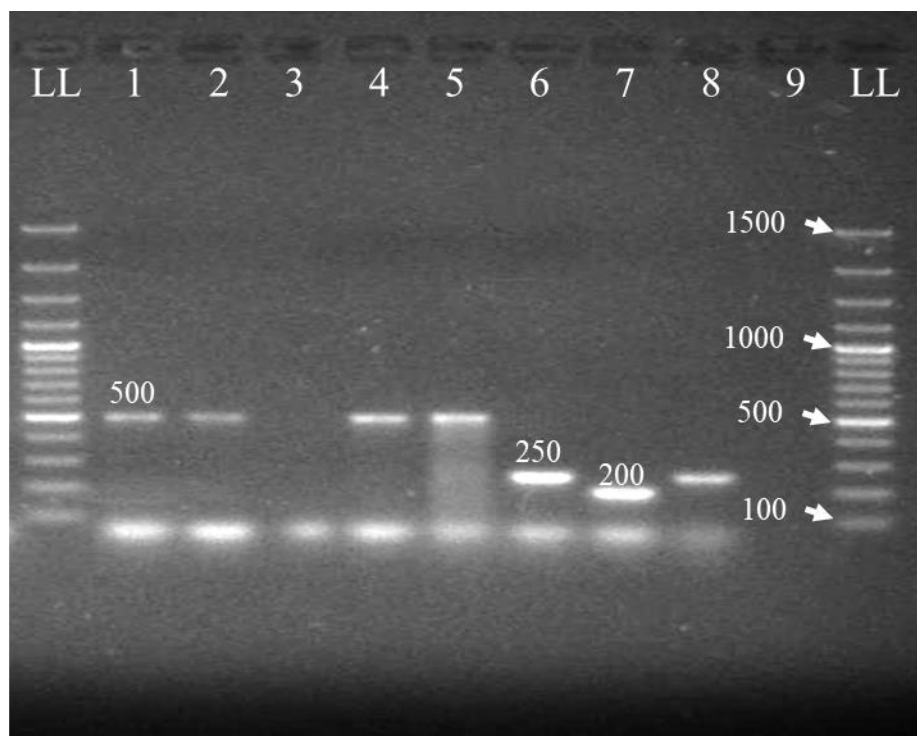


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR Multiplex Antígenos flagelares1 Ladder 100~1200 pb (HyperLadder™ 100bp, Bioline) : Carril 1) *S. Dublín* (H:G); Carril 2) muestra positiva (H:G); Carril 3) muestras negativa (S20); Carril 4) muestras positiva (H:G); Carril 5) muestra positiva (H:G); Carril 6) muestra positiva (H:i); Carril 7) muestra positiva (H:e,h); Carril 8) muestra positiva (H:i); Carril 9) control negativo.

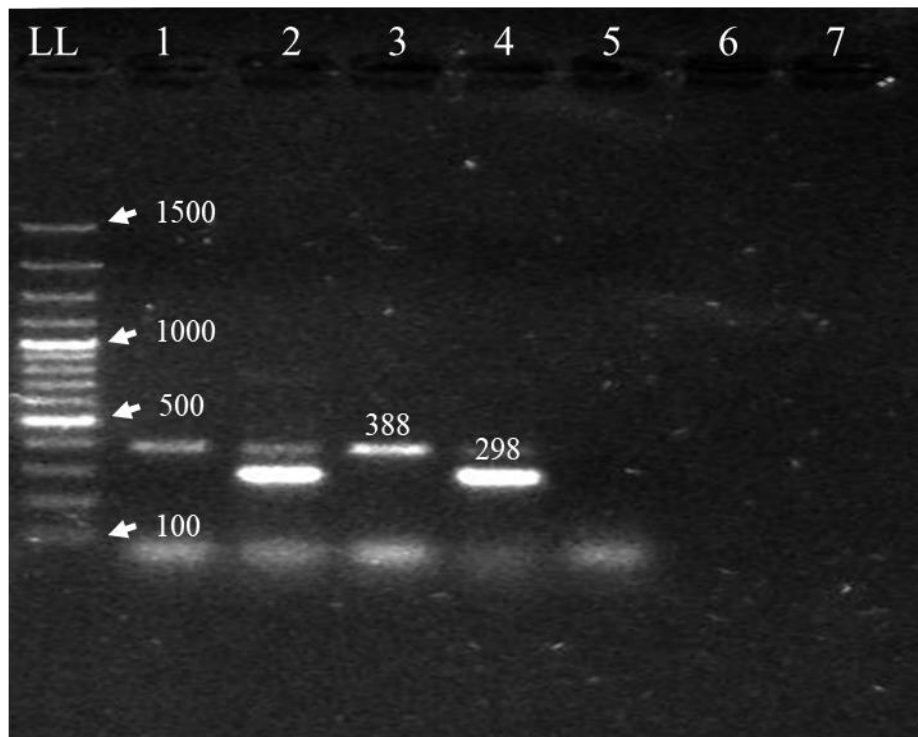


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR Multiplex Antígenos flagelares
2 Ladder 100~1200 pb (HyperLadder™ 100bp, Bioline): Carril 1) *S. Typhimurium* (H: 1,2);
Carril 2) *S. Anatum* (H: 1:6); Carril 3) muestras (H: 1,2) positiva; Carril 4) muestra
positiva (H: 1,6); Carril 5) control negativo.

7.3- Disco Difusión Agar (DDA)

El 94,7 % (100/107) de los aislados fueron resistentes a un antibiótico al menos. Se hallaron 44 patrones distintos de resistencia (anexo II) mediante esta metodología, encontrándose 28 aislamientos que presentaron multirresistencia. Los resultados obtenidos de la resistencia de los aislamientos se presentan resumidos en el cuadro VIII.

Cuadro VIII: Porcentajes de resistencia obtenidos por el método de disco de los 107 aislamientos de *Salmonella enterica*.

ATB	S	I	R
AMP	80,4	1,9	17,8
AMC	92,5	4,7	2,8
CTX	93,5	0	6,5
CAZ	95,3	4,7	0
CIP	81,3	16,8	1,9
NAL	91,6	2,8	5,6
CN	85,0	0	15,0
C	95,3	0	4,7
STX	96,3	0	3,7
TC	66,4	1,9	31,8
K	73,8	16,8	9,3
ENR	91,6	5,6	2,8
AK	95,3	0	4,7
FOS	100	0	0
S	16,8	56,1	27,1

ATB: antibiótico, S: sensible, I: intermedio, R: resistente. AMP: Ampicilina; AMC: amoxicilina + ácido clavulánico; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; NAL: ac. nalidíxico; ENR: enrofloxacina; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; AK: akamicina; S: estreptomina; K: kanamicina; TC: tetraciclina; STX: sulfametoxazol + trimetoprima; C: cloranfenicol; FOS: fosfomicina.

7.3.1- Test de sinergia en disco

A todos los aislamientos que fueron resistentes a cefotaxima (cefalosporina de tercera generación) se les realizó el test de sinergia para detección de BLEE siendo positivos al mismo.



Figura 7: Método del doble disco para la detección de BLEE. Aislamientos de *Salmonella enterica*. 1: Se observa el efecto sinérgico (halos de inhibición como indica la flecha) que se produce entre el disco de cefotaxime (CTX) disco de amoxicilina, ácido clavulánico (AMC). 2: Se observa el efecto sinérgico (halos de inhibición como indica la flecha) que se produce entre los discos de cefotaxime (CTX) y ceftazidima (CAZ) disco de amoxicilina, ácido clavulánico (AMC) confirmando en ambos casos la presencia de BLEE

7.4- Concentración inhibitoria mínima (CIM)

En el estudio de la concentración inhibitoria mínima de los 107 aislamientos se determinó que el 51,40% (55/107) fueron resistentes a por lo menos un antibiótico (cuadro IX). Se observaron 35 patrones de resistencia diferentes (anexo II). El 25,23% (27/107) de los aislamientos presentaron multirresistencia (anexo III).

Cuadro IX: Distribución de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los 107 aislamientos de *Salmonella enterica*.

ATB	Diluciones															% R	% I	% S
	0,06	0,12	0,5	1	2	>2	4	>4	8	>8	16	>16	32	>32	64			
AMP									80	0	3	24				22.42	2.80	74.78
FOT				94	0	0	0	0	1	0	1	0	5	6		12.14	-	87.86
A/S2									83	0	9	15				14.0	8.40	77.60
P/T4									106	0	0	0	1			0.93	-	99.07
FEP					93	0	7	0	4	0	2	1				6.50	6.5	87.00
MERO				107	0											-	-	100
IMI			106	1												-	-	100
AK									102	0	3	0	2			4.67	-	95.33
LEVO		98	2	3	4											3.7	2.80	93.50
CIP	96	1	2	1	2	4										10.28	-	89.72
MIN							90	0	11	6						5.6	10.28	84.12
TGC			107													-	-	100
FUR							52	0	41	1	13					13.08	-	86.92
ETP				107												-	-	100
COL				87	7	0	4	9								12.14	-	87.86
FOX									105	0	2					-	1.86	98.14
NIT													106	1	0	-	-	100
FOS													106	0	1	0.93	-	98.14
SXT					101	6	0									5.60	-	94.40
CHL									100	0	3	4				6.5	1.86	91.64
AMC									103	0	3	1				3.73	-	96.27
NAL											100	7				6.5	-	93.5

ATB: antibióticos, %R: porcentaje de Resistencia, I: porcentaje de Intermedio, %S: porcentaje de Sensibles, AMP: Ampicilina, FOT: Cefotaxima, A/S2: Ampicilina/ sulbactam 2:1, P/T4- Piperacilina/ tazobactam constant 4, FEP: Cefepima, MERO: Meropenem, IMI: Imipenem, AMI: Amikacina, LEVO: Levofloxacin, CIP: Ciprofloxacina, MIN: Minociclina, TGC: Tigeciclina, FUR: Cefuroxima, ETP: Ertapenem, COL: Colistina, FOX: Cefoxitina, NIT: Nitrofurantoína, FOS+: Fosfomicina+glucosa-6-fosfato, SXT: Trimetoprim/ sulfametoxazol, CHL: Cloranfenicol, AUG2: Amoxicilina/ ácido clavulánico 2:1, NAL: Ácido nalidíxico.

7.5- PCR *Salmonella* Typhimurium DT104

Dentro de los 69 aislamientos tipificados como *S. Typhimurium* se detectaron 39 aislamientos positivos al gen *ST104* amplificando una banda de 312pb (figura 8). A su vez los restantes 38 aislamientos de *Salmonella* pertenecientes a otros serogrupos (*S. Dublin*, *S. Montevideo*, *S. Anatum*, *S. Give*, *S. Enteritidis*) resultaron negativos al mismo. En el estudio de sensibilidad a antibióticos en disco difusión entre los positivos a *ST104* los perfiles fenotípicos presentaron resistencia (anexo VI) 84,61% (33/39) a estreptomicina, 56,41% (22/39) a tetraciclina, 25,64 % (10/39), a ciprofloxacina, 12,82 % (5/39) a ampicilina, 10,25% (4/39) gentamicina, 5,1% (2/39) a cloranfenicol, 5,1 % (2/39) a sulfametoxasol + trimetropin. Solo un aislamiento presento el perfil de resistencia ACSSuT 2,56 % (1/39). Se encontró la presencia de aislamientos sin resistencia fenotípica en el 5,1% (2/39). En tanto la combinación Tetraciclina y Estreptomicina 23% (9/39) fue el perfil más común encontrado.

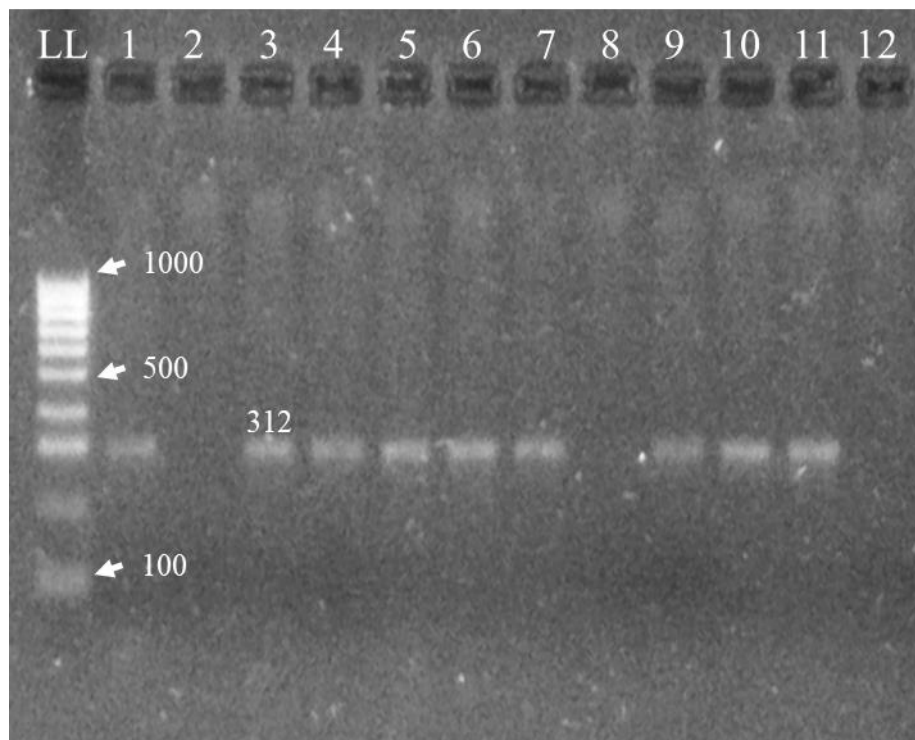


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR ST 104 Ladder 100~1200 pb (HyperLadder™ 100bp, Bioline): Carril 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9,10, 11 asilamientos tipificados como *Salmonella* Typhimurium positivas ST104; Carril 2 y 8 asilamientos tipificados como *Salmonella* Typhimurium negativas a gen ST 104; Carril 12) control negativo.

7.6- Detección de genes de resistencia a los betalactámicos tipo TEM, SVH, CTX-M

De los 107 aislamientos que se les realizó PCR multiplex en busca de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos (Figura 9, 10 y 11), 7 de los mismos resultaron positivos a betalactamasas de espectro extendido CTX-M (543pb), mientras que 8 fueron positivas a betalactamasas de espectro reducido, 6 a TEM (900pb) y 2 a SVH (620pb). Los aislamientos que portaban genes a CTX-M fueron positivos en el test de sinergia realizado. También se observó resistencia entre los aislamientos positivos a genes BLEE a fluroquinolonas y aminoglucósidos (cuadro X).

Cuadro X: Perfiles de resistencia de los aislamientos positivos a BLEE.

ID	CTX-M	PERFIL DISCO	PERFIL MIC
S60	+	AMP-AMC-CTX-S	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR
S71	+	AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR
S76	+	AMP-AMC-CTX-K-S	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR
S79	+	AMP-AMC-CTX-CAZ-CN-K-S	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR
S80	+	AMP-CTX-K-S	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR
S81	+	AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-C-S	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR-AUG2
S82	+	AMP-CTX-CAZ-K-S	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR

ID: identificación, MIC: concentración inhibitoria mínima; AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina + ácido clavulánico, CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima, CIP: Ciprofloxacina, S: estreptomicina, K: kanamicina, C: cloranfenicol, FOT: Cefotaxima, FEP: Cefepima, FUR: Cefuroxima, A/S2: Ampicilina/ sulbactam, AUG2: Amoxicilina/ ácido clavulánico.

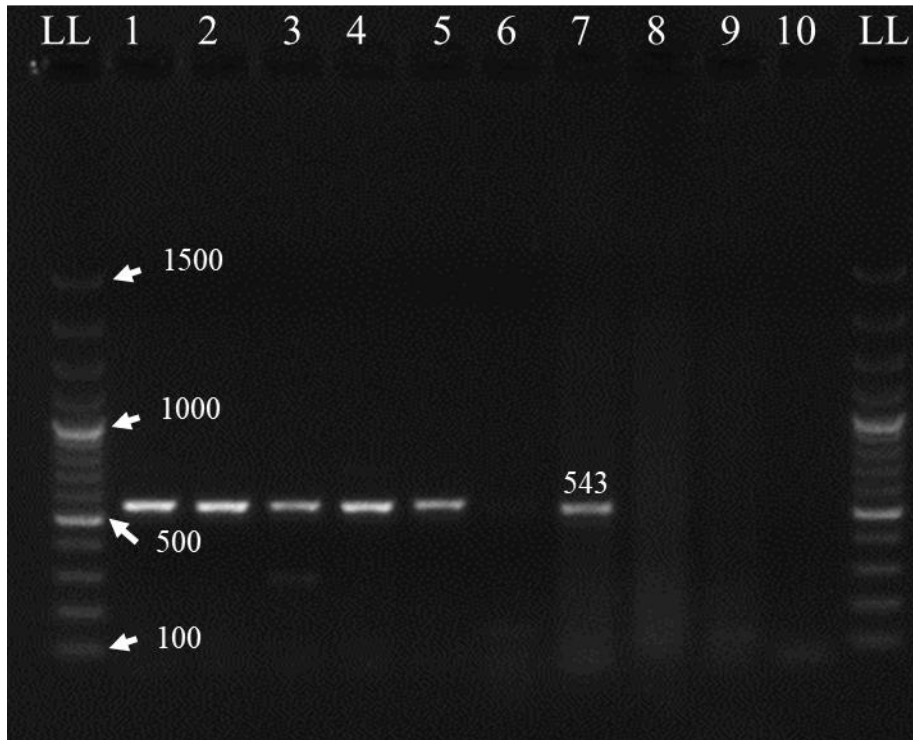


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR gen Pan_{CTX-M} en aislamientos de *Salmonella* spp. Ladder 100~1200 pb (HyperLadder™ 100bp, Bioline): Carril 1 control positivo; Carril 2, 3, 4, 5, 7 aislamientos de *Salmonella* spp positivos gen Pan_{CTX-M}. Carril 6, 8, 9 aislamientos de *Salmonella* spp. negativos al gen Pan_{CTX-M}; Carril 10 control negativo.

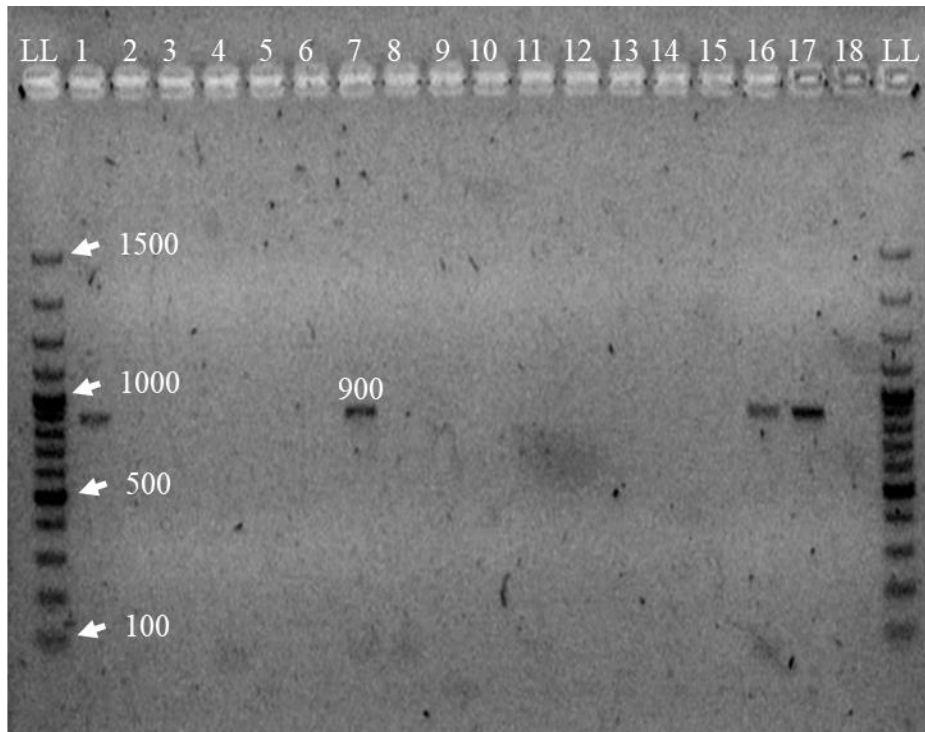


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR gen bla_{TEM} en aislamientos de *Salmonella* spp. Ladder 100~1200 pb (HyperLaddertm 100bp, Bioline): Carril 1 control positivo; Carril 7, 16, 17 aislamientos de *Salmonella* spp. positivos al gen bla_{TEM}; Carril 2, 3, 4, 5, 6, 8, 15 aislamientos de *Salmonella* spp. negativos al gen bla_{TEM}; Carril 8 control negativo.

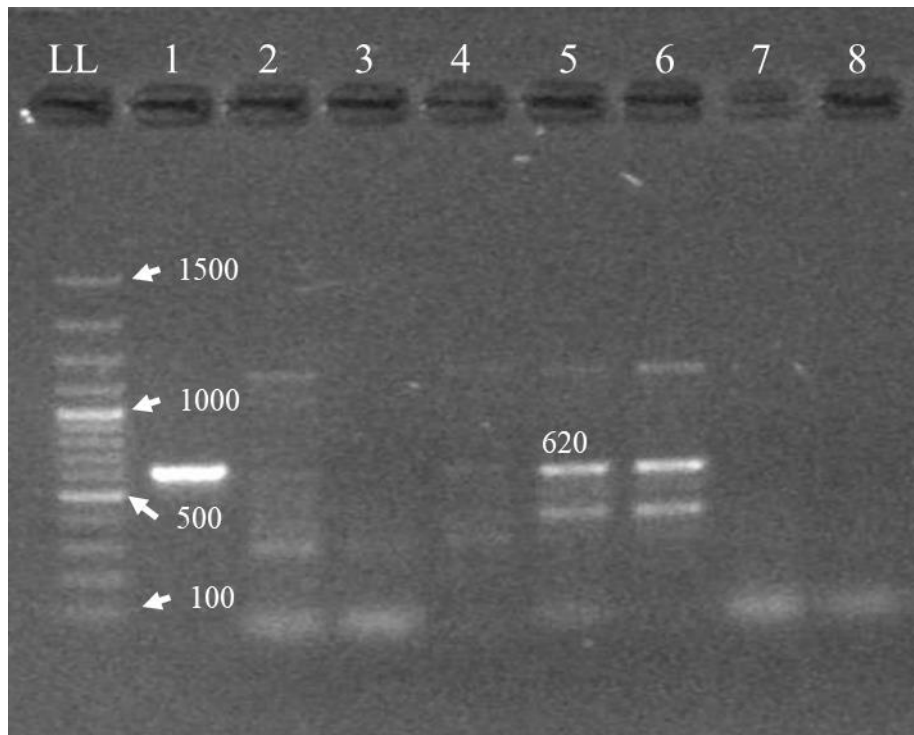


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) PCR gen bla_{SHV} en aislamientos de *Salmonella* spp. Ladder 100~1200 pb (HyperLadder™ 100bp, Bioline); Carril 1 control positivo; Carriles 5 y 6 aislamientos de *Salmonella* spp. positivos al gen bla_{SHV} ; Carriles 2, 3, 4, 7, 15 aislamientos de *Salmonella* spp. negativos al gen bla_{SHV} ; Carril 8 control negativo.

8- DISCUSIÓN

En el presente estudio se destaca la presencia de aislamientos productores de enzimas BLEE y positivos al gen *bla_{CTX-M}*. Este resultado se explicaría porque la resistencia mediada por enzimas es el principal mecanismo frente antibióticos betalactámicos, siendo la más comúnmente encontrada en bovinos (Palmeira y Ferreira, 2020). En este sentido Canton et al. (2012), describen que CTX-M es la BLEE más prevalente a nivel mundial en enterobacterias tanto en el hombre como en animales. El hallazgo obtenido en este trabajo no es el primer reporte en bovinos a nivel mundial. Se ha reportado en más de 39 países tanto en animales sanos (portadores) como en animales enfermos de mastitis o diarrea (Palmeira y Ferreira, 2020). En Reino Unido, Alemania, Francia y Estados Unidos se ha detectado mayor presencia de BLEE en bovinos (Palmeira y Ferreira, 2020). En tanto en América del Sur la notificación no es frecuente, existiendo escasos datos a nivel molecular (Palmeira y Ferreira, 2020; Plassard et al., 2020). Por otro lado, en Uruguay, Bado et al. (2012) reportaron enzimas CTX-M-14 en *Salmonella enterica* aisladas de humanos, que junto con CTX-M-15 son las de mayor prevalencia en bovinos a nivel mundial (Bado et al., 2016; Palmeira y Ferreira, 2020). En nuestro trabajo encontramos aislamientos positivos a CTX-M que presentaron resistencia fenotípica a aminoglucósidos y en un aislamiento se observó resistencia a quinolonas. Esto podría explicarse porque los microorganismos productores de BLEE pueden codificar múltiples genes de resistencia, generando resistencia cruzada entre tetraciclinas, sulfas, quinolonas, aminoglucósidos. Estos genes pueden ser transmitidos en conjunto por paquetes génicos, de acuerdo a lo descrito por Bado et al. 2010 y Miranda-García (2013).

La alta resistencia a los antibióticos principalmente frente a tetraciclina, estreptomycinina y ampicilina encontrada en este trabajo concuerdan con los reportado por Pereira et al. (2019) en Estados Unidos y Casaux et al (2019) en Uruguay. Estos hallazgos podrían ser consecuencia de su elevado uso para tratar enfermedades en bovinos de acuerdo a lo descrito por Wang et al. 2020. A su vez la multirresistencia (MDR) presentada por los aislamientos en este trabajo podría tener un componente multifactorial. Por un lado, la presión de selección causada por un uso inadecuado de antibióticos, así como de la propagación clonal de fenotipos resistentes, son las principales causas de RAM en el mundo (Call et al., 2008; Sato et al., 2014; Ma et al., 2019). Por otro lado, los aislamientos de *Salmonella enterica* al estar presentes en reservorios naturales como suelo y agua podrían diseminarse fácilmente a través del ambiente. Esto permitiría al microorganismo adquirir genes de resistencia por transmisión horizontal a través de elementos móviles con bacterias saprofitas (Peng et al., 2018; Cummings et al., 2013). En cuanto a los valores de MDR encontrados en este estudio son inferiores a lo reportado en Uruguay (34%) por Casaux et al. 2019, pero superior a Estados Unidos (12%) en predios lecheros (Pereira et al., 2019).

Asimismo, se observó resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, ciprofloxacina y colistina. Este hallazgo es de gran importancia dado que están dentro de los antibióticos reservados para tratar infecciones graves en humanos, estando incluidos en la Lista de la OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana (OMS, 2019). Dicha resistencia es un riesgo no solo para la salud animal sino también para la Salud Pública (Plassard et al., 2020). En el caso de los betalactámicos se explicaría debido a que son los antibióticos más utilizados a nivel mundial (Cantón et al., 2012). En el mismo sentido, Olanrewaju et al. (2020), señalan que las cefalosporinas de 3ra, 4ta generación y carbapenemas representan el 65% de todos los antibióticos utilizados en Estados Unidos. En tanto Guerrero et al. (2021), describe que aminopenicilinas, cefalosporinas de tercera generación son antibióticos frecuentemente prescritos de forma inadecuada en tratamientos en medicina humana en Uruguay. En nuestro trabajo encontramos una resistencia moderada (>10 al 20%) a ciprofloxacina de 10.28%, siendo similar a lo reportado en la Unión Europea 12,5% por la EFSA, 2019 (European Food Safety Authority), pero superior a la baja resistencia encontrada (>1 al 10%) en Estados Unidos de 5% y en España 8,3% en bovinos (EFSA, 2019; Pereira et al., 2019). Asimismo, estos valores fueron inferior a la alta resistencia (>20 al 50%) reportada en Italia 25% y en Uruguay 22% (Casaux et al., 2019; EFSA, 2019). Con relación a colistina, la resistencia encontrada en este estudio debe considerarse de importancia, debido a que actualmente es un antimicrobiano de último recurso para el control de bacterias Gram negativas multirresistentes, así como por la posibilidad de transmisión de su resistencia de forma plasmídica (Zahedi & Samadi 2015; Lima et al., 2019). Es importante destacar que a partir del año 2019 en Uruguay se prohibió el uso de este antibiótico como aditivo de crecimiento y tratamiento de infecciones en animales (MGAP, 2019).

Más de la mitad de los aislamientos de obtenidos *S. Typhimurium* 56,5% (39/69) resultaron ser la variante DT104 (positivos al gen ST104). Esto concuerda con lo reportado por Parker et al. (2021) que esta variante sería la más común a nivel mundial. *Salmonella* Typhimurium DT104 es diez veces más virulenta comparada con otros serotipos de *Salmonella enterica* descrita en animales de compañía, animales silvestres, bovinos y el hombre (Murphy, 2001); siendo el fagotipo más frecuente en Estados Unidos y Reino Unido (Murphy, 2001; Okamura et al., 2010). De acuerdo con Besser et al., 2000 el perfil fenotípico ACSSuT (resistencia a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomina, sulfametoxazol) es el más característico para este fagotipo, en nuestro trabajo solamente un aislamiento de esta variante presentó este perfil. En tanto se encontró que un 5,1% (2/39) de los aislamientos de *Salmonella* Typhimurium DT104 presentaron ausencia de resistencia fenotípica, concordando con lo reportado autores como Zhao et al (2013) y posteriormente Tang et al (2019) que describieron cepas de esta variante que no presentan resistencia. La ausencia de resistencia podría estar relacionado a la pérdida de alguno de los cinco genes que codifican proteínas relacionadas a este perfil fenotípico (Tang et al., 2019). Se postula que en condiciones ambientales favorables para el microorganismo puedan perder los genes de resistencia y recuperarlos para su

supervivencia de ser necesario, puesto que mantener estos factores demandan un consumo de energía elevado (Tang et al. 2019).

Dentro de los aislamientos de *S. enterica* obtenidos en este trabajo se determinaron cuatro serogrupos (B, C, D y E). Se destacó el grupo B (64,5%) como el más frecuente seguido del grupo D (19,6%). Esto es similar a lo reportado por Fossler et al. (2004), donde describe al grupo B como el más importante en predios lecheros de Estados Unidos. En nuestro trabajo encontramos que *S. Typhimurium* y *S. Dublin* fueron los serotipos más frecuentes al igual que Casaux et al. (2019) en Uruguay, Bilbao et al. (2019) en Argentina, Sato et al. (2018) en Estados Unidos. Los otros serotipos encontrados (*S. Montevideo*, *S. Anatum*, *S. Give*, *S. Enteritidis*) en este estudio han sido relacionados a infecciones tanto en animales como en el hombre (Sato et al., 2001; Mohler et al., 2009; Casaux et al., 2019). En los aislamientos que no fue posible llegar al serovar a través de la PCR multiplex, fue necesaria la combinación con otras técnicas como la serología tradicional para caracterizar *Salmonella enterica* coincidiendo con los descripto por Bisio, (2017).

9- CONCLUSIONES

La detección de *Salmonella* productoras de BLEE tipo CTX-M, así como la presencia de fagotipo DT104 dentro de los aislamientos de *S. Typhimurium* constituye uno de los primeros reportes en bovinos en nuestro país.

Se detectó multirresistente en más del 20% de los aislamientos estudiados (a tres o más clases).

Los seis serovares (*S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Montevideo*, *S. Anatum*, *S. Give*, *S. Enteritidis*) detectados en este estudio se encuentran entre los más prevalentes reportados en bovinos. En tanto 64,48 % de los aislamientos fue *S. Typhimurium*.

La posibilidad de la serotipificación o detección de genes específicos de resistencia (BLEE) en laboratorios de diagnóstico veterinario aporta al estudio de la enfermedad, a la vigilancia de la RAM y a la instauración de medidas de control adecuadas de manera temprana.

10- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup F. (2005). Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Pharmacology Toxicology*. 96: 271-334.
- Abu Aboud, O. A., Adaska, J.M., Williams, D. R., Rossitto, P. V., Champagne, J.D., Lehenbauer, T. W., Atwill R., Li X., Aly S. S. (2016). Epidemiology of Salmonella sp. in California cull dairy cattle: prevalence of fecal shedding and diagnostic accuracy of pooled enriched broth culture of fecal samples. *PeerJ* (4):13 10.7717/peerj.2386
- Alexander, K. A., Warnick, L. D., Wiedmann, M. (2009). Antimicrobial resistant Salmonella in dairy cattle in the United States. *Vet Res Commun*. 33(3):191-209. doi: 10.1007/s11259-008-9170-7.
- Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frere, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M. (1991). A standard numbering scheme for the class β -lactamases. *The Biochemical Journal*, 276, 269–270.
- Bado, I., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N. F., Betancor, L., Caiata, L., Seija, V., Robino, L., Algorta, G., Chabalgoity, J. A., Ayala, J. A., Gutkind, G. O., Vignoli, R. (2012). First human isolate of Salmonella enterica serotype Enteritidis harboring blaCTX-M-14 in South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(4):2132-4. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.05530-11>
- Bado, I., Gutiérrez, C., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N. F., Araújo-Pirez, L., Seija, V., Bazet, C., Rieppi, G., Vignoli, R. (2016). CTX-M-15 en combinación con aac(6')-Ib-cr es el mecanismo de resistencia más prevalente tanto en Escherichia coli como en Klebsiella pneumoniae, incluyendo K. pneumoniae ST258, en una UCI de Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist*. 6: 5-9. 10.1016/j.jgar.2016.02.001
- Bado, I., Cordeiro, N. F., Robino, L., García-Fulgueiras, V., Seija, V., Bazet, C., Gutkind, G., Ayala, J. A., Vignoli, R. (2010). Detección de integrones de clase 1 y 2, β -lactamasas de espectro extendido y alelos qnr en aislamientos de enterobacterias del tracto digestivo de pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos. *Int J Antimicrob Agents*. 36:453-458.
- Besser, T. E., Goldoft, M., Pritchett, L. C., Khakhria, R., Hancock, D. D., Rice, D.H., Gay, J.M., Johnson, W., Gay, C. C. (2000) Multiresistant Salmonella Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. *Epidemiol Infect*. 124(2):193-200. doi: 10.1017/s0950268899003283.
- Bialvaei, A. Z., Kafil, H. S., Asgharzadeh, M., Aghazadeh, M., Yousefi, M. (2016). CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella spp, Salmonella spp, Shigella spp and Escherichia coli isolates in Iranian hospitals. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(3): 706-711. 10.1016/j.bjm.2016.04.020

- Bilbao, GN., Malena, R., Passucci, JA., Pinto de Almeida Castro, AM., Paolicchi, F., Soto, P., Cantón, J., Monteavaro, CE. (2019). Detección de serovares de Salmonella en terneros de crianza artificial de la región lechera Mar y Sierras, Argentina [Detection of serovars of Salmonella in artificially reared calves in Mar y Sierras Dairy Basin, Argentina]. *Rev Argent Microbiol.* 51(3):241-246. doi: 10.1016/j.ram.2018.09.003.
- Bisio, J, (2017). Evaluación de métodos moleculares como reemplazo para la serotipificación clásica de Salmonella entérica [Tesis de grado no publicada] Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1211–1233
- Caffarena, R. D., Casaux, M. L., Schild, C. O., Fraga, M., Castells, M., Colina, R., Maya, L., Corbellini, L. G., Riet-Correa, F., Giannitti, F.(2021). Causes of neonatal calf diarrhea and mortality in pasture-based dairy herds in Uruguay: a farm-matched case-control study. *Braz J Microbiol.* 52(2):977-988. doi: 10.1007/s42770-021-00440-3.
- Caffer, I., Terragno, R., Binsztein, N (2008). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de Salmonella spp: en Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv. Disponible <https://docplayer.es/16682925-Manual-de-procedimientos.html>
- Call, D. R., Davis, M. A., Sawant, A. A. (2008). Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Anim Health Res Rev*;9(2):159-67. doi: 10.1017/S1466252308001515.
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Mirelis, C. B., Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *SEMIC*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* 2012 Apr 2;3:110. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110. PMID: 22485109; PMCID: PMC3316993.
- Cantón, R. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica, enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 28 (6):375-385 <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.01.001>.
- Casaux, M. L., Caffarena, R. D., Schild, C. O., Giannitti, F., Riet-Correa, F., Fraga, M. (2019). Antibiotic resistance in Salmonella enterica isolated from dairy calves in Uruguay. *Braz J Microbiol.* 50(4):1139-1144. doi: 10.1007/s42770-019-00151-w.
- Chacón, L., Barrantes, K., García, C., Achí, R. (2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen invA de Salmonella spp. en lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1), 18-

23.http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562010000100005&lng=es&tlng=es.

- Cheng, R. A., Eade, C. R., Wiedmann, M. (2019). Embracing Diversity: Differences in Virulence Mechanisms, Disease Severity, and Host Adaptations Contribute to the Success of Nontyphoidal Salmonella as a Foodborne Pathogen. *Frontiers in microbiology*, 10, 1368. doi:10.3389/fmicb.2019.01368
- Chiu, C. H., Ou, J. T. (1996). Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol.* 34(10):2619-22. doi: 10.1128/jcm.34.10.2619-2622.1996.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
- CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition; CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 296 pp.
- Coura, FM., Zambrano, JA., Facury, PV., Último de Carvalho, A., Facury, EG., Prado MV., Pereira, A., Bryan, M (2015). Systemic and enteric salmonellosis in calves. *Semina. Ciênc. Agrár. Vol 36(3): p.2041-2046* doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n3Supl1p2041.
- Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ.* 2004 May; 82(5):346-53. PMID: 15298225; PMCID: PMC2622843.
- Cummings, K. J., Perkins, G. A., Khatibzadeh, S. M., Warnick, L. D., Altier, C. (2013). Antimicrobial resistance trends among Salmonella isolates obtained from dairy cattle in the northeastern United States, 2004–2011. *Foodborne Pathog Dis* 2013; 10:353–361.
- Daniel, G. W., Schneider, M., McClellan, M. B. (2017). Addressing antimicrobial resistance and stewardship: The priority antimicrobial value and entry (PAVE) award. *JAMA*, 318(12): 1103-1104.
- Dykes, G. (2015). Salmonella: Detección. En *Enciclopedia de la Alimentación y la Salud*, 689-694.
- Echeita, M. A., Herrera, S., Garaizar, J., Useraa, (2002). Multiplex PCR-based detection and identification of the most common Salmonella second-phase flagellar antigens. *Research in Microbiology* (153): 107–113.
- EFSA. (2019). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal*, 17(2). Retrieved from <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5598>

- Eguale, T., Engidawork, E., Gebreyes, W. A., Asrat, D., Alemayehu, H., Medhin, G., Johnson, R. P., Gunn, J. S. (2016). Fecal prevalence, serotype distribution and antimicrobial resistance of Salmonellae in dairy cattle in central Ethiopia. *BMC Microbiol.* 16; 16:20. doi: 10.1186/s12866-016-0638-2.
- Eng, S. K., Pusparajah, P., A. B., Mutalib, N. S., Leng, S. H., Chan., K. G., Learn Han, L. (2015). Salmonella: una revisión de la patogenia, la epidemiología y la resistencia a los antibióticos. *Fronteras en Ciencias de la Vida*, 8 (3), 284 - 293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- EUCAST. (2022). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Retrieved from https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf
- Fossler, C. P., Wells, S. J., Kaneene, J. B., Ruegg, P. L., Warnick, L. D., Bender, J. B., ... Geiger Zwald, A. M. (2004). Prevalence of Salmonella spp on conventional and organic dairy farms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(4), 567-573. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.225.567>
- García, C. S., de la Gándara, M. P., García, F. J. C. (2010). B-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichiacoli y Klebsiella. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 12-18.
- Garrec, H., Drieux-Rouzet, L., Golmard, J. L., Jarlier, V., Robert, J. (2011). Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 49(3):1048-57. doi: 10.1128/JCM.02130-10.
- Geser, N., Stephan, R., Kuhnert, P., Zbinden, R., Kaeppli, U., Cernela, N., Haechler, H. (2012). Fecal Carriage of Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Swine and Cattle at Slaughter in Switzerland. *Journal of Food Protection*. 74(3): 446-449 doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-372
- Graziani, C., Losasso, C., Luzzi, I., Ricci, A., Scavia, G., & Pasquali, P. (2017). Salmonella. In *Foodborne Diseases: Third Edition* (37):133-169. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00005-X>
- Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2008). *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars* 9th edn. (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella).
- Guerrero, A. L., Andrade, R., Saavedra, M., Casuriaga, A., Notejane, M., Giachetto, G. (2021). Prescripción de antibióticos en salas de cuidados moderados del Hospital Pediátrico, Centro Hospitalario Pereira Rossell, Uruguay. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 92 (1)204 <https://doi.org/10.31134/ap.92.1.5>

- Harvey, R. R., Friedman, C. R., Crim, S. M., Judd, M., Barrett, K. A., Tolar, B., Folster, J. P., Griffin, P. M., Brown, A. C. (2017). Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Dublin infections among humans, United States, 1968 – 2013. *Emerg Infect Dis*, 23(9), 1493-1501.
- Helms, M., Ethelberg, S., Mølbak, K. (2005). DT104 Study Group. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect* 11(6):859-67. doi: 10.3201/eid1106.041017
- Herrera-Leo'n, S., McQuiston, J., Usera, M., Fields, M., Garaizar, J., Echeita M. A. (2004). Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (42): 2581–2586.
- Herrera-Leo'n, S., Ramiro, R., Arroyo, M., Díez, R., Usera, M. A., Echeita, M. A. (2007). Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Research in Microbiology* 158: 122-127.
- Hur, J., Jawale, C., Lee, J.H. (2012). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International* 45 (2):819–830. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.014>
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary world*, 12(4), 504–521. doi:10.14202/vetworld.2019.504-521
- Karmi, M. (2013). Detection of Virulence Gene (*invA*) in *Salmonella* Isolated from Meat and Poultry Products. *International Journal of Genetics* 3(2): 07-1210.5829/idosi.ijg.2013.3.2.82204
- Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C. L., Hald, T., Hall, A. J., Keddy, K. H., Lake, R. J., Lanata, C. F., Torgerson, P. R., Havelaar, A. H., Angulo, F. J. (2015) World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLOS Medicine* 12(12): e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
- Lee, S., Mir, R. A., Park, S. H., Kim, D., Kim, H.Y., Boughton, R.K., Morris, J.G. Jr., Jeong, K.C. (2020). Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in the local farm environment and livestock: challenges to mitigate antimicrobial resistance. *Crit Rev Microbiol* 46:1–14. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1715339>
- Leekitcharoenphon, P., Hendriksen, R. S., Le Hello, S., Weill, F. X., Baggesen, D. L., Jun, S. R., Ussery, D. W., Lund, O., Crook, D. W., Wilson, D. J., Aarestrup, F. M. (2016). Global Genomic Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol*. 4;82(8):2516-26. doi: 10.1128/AEM.03821-15.

- Lezameta, L., Gonzáles-Escalante, E., Tamariz, J. H. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido [Comparison of four phenotypic methods to detect extended-spectrum betalactamases]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 27(3):345-51. doi: 10.1590/s1726-46342010000300006.
- Lima, T., Domingues, S., Da Silva, GJ (2019). Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms*. 19;7(2):55. doi: 10.3390/microorganisms7020055. PMID: 30791454
- Ma, Z., Lee, S., Jeong, K. C. (2019). Mitigating Antibiotic Resistance at the Livestock-Environment Interface: A Review. *J Microbiol Biotechnol*. 28; 29(11):1683-1692. doi: 10.4014/jmb.1909.09030. PMID: 31693837.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal salmonella gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882-889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Martínez-Martínez, L., Calvo, J. (2010). El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 28(2):25-31. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70027-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70027-6)
- Mather, A. E., Matthews, L., Mellor, D. J. (2011). An ecological approach to assessing the epidemiology of antimicrobial resistance in animal and human populations. *Proc Biol Sci* 279: 1630–39. Revisado. <http://bit.ly/2iCwvnu>
- MGAP. Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay (2017).
- Miranda-García, M. C. (2013). *Escherichia coli* portador de β -lactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*, 69(4), 244-248. <https://dx.doi.org/10.4321/S1887-85712013000400003>
- Mohler, V. L., Izzo, M. M., House, J. K. (2009) *Salmonella* in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 25 (1):37-54, VI. doi: 10.1016/j.cvfa.2008.10.009.
- MSP, (2017). Boletín Epidemiológico mayo 2017. Disponible en: http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Bolet%20Epidemiol%20Mayo%202017.7%20corregido%20por%20Quian%201_.pdf.
- Murphy, T. M., McNamara, E., Hill, M., Rooney, N., Barry, J., Egan, J., O'Connell, A., O'Loughlin, J., McFadden, S. (2001). Epidemiological studies of human and animal

- Salmonella typhimurium DT104 and DT104b isolates in Ireland. *Epidemiol Infect.* 126(1):3-9. doi: 10.1017/s0950268801005143.
- Olanrewaju, J., Ogunrinu, O. J., Norman, K. N., Vinasco, J., Levent, G., Lawhon, S. D., Fajt, V. R., Volkova, V. V., Gaire, T., Poole, T. L., Genovese, K. J., Wittum, T. E., Scott, H. M., (2020). Can the use of older-generation beta-lactam antibiotics in livestock production over-select for beta-lactamases of greatest consequence for human medicine? An in vitro experimental model. *PLoS One.* 16;15(11):e0242195. doi: 10.1371/journal.pone.0242195.
- Okamura, M., Sonobe, M., Obara, S., Kubo, T., Nagai, T., Noguchi, M., Takehara, K., Nakamura, M. (2010). Potential egg contamination by Salmonella enterica serovar Typhimurium definitive type 104 following experimental infection of pullets at the onset of lay, *Poultry Science.* Vol 89 (8): 1629-1634p <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00774>
- Organización Mundial de la Salud (2019). Lista OMS de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana (lista OMS de AIC). Disponible chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325037/WHO-NMH-FOS-FZD-19.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2008). Salmonelosis En: OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. OIE, París, OIE Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.08_SALMONELLOSIS.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2018). Salmonelosis En: OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. OIE, París, OIE Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.08_SALMONELLOSIS.pdf
- Parker, C. T., Huynh, S., Alexander, A., Oliver, A. S., Cooper, K. K. (2021). Caracterización genómica de cepas de Salmonella typhimurium DT104 asociadas con ganado bovino y productos cárnicos. *Patógenos* , 10 (5), 529.
- Palmeira, J., Ferreira, H. M. N. (2020). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production - a threat around the world. *Heliyon.* 30; 6(1): e03206. 10.1016/j.heliyon. 2020.e03206.
- Peng, M., Salaheen, S., Buchanan, R. L., Biswas, D. (2018). Alterations of Salmonella enterica serovar typhimurium antibiotic resistance under environmental pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e01173-18. 10.1128/AEM.01173-
- Pereira, R., Williams, D. R., Rossitto, P., Adaska, J., Okello, E., Champagne, J., Lehenbauer T. W., Li, X., Chase, J., Nguyen, T., Pires, A. F. P., Atwill E. R., Aly S. S. (2019). Association between herd management practices and antimicrobial resistance in Salmonella spp. from cull dairy cattle in Central California. *PeerJ* 7:e6546 <https://doi.org/10.7717/peerj.6546>

- Plassard, V., Gisbert, P., Granier, S. A., Millemann, Y. (2021). Surveillance of Extended-Spectrum β -Lactamase-, Cephalosporinase- and Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Raw Milk Filters and Healthy Dairy Cattle in Three Farms in Île-de-France, France. *Front Vet Sci.* 10;8:633598. doi: 10.3389/fvets.2021.633598.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W. (2002). *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino.* 9na ed. Madrid, Interamericana.
- Sato, K., Carpenter, T.E., Case, J.T., Walker, R.L (2001). Spatial and temporal clustering of Salmonella serotypes isolated from adult diarrheic dairy cattle in California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 13(3):206-212p DOI: 10.1177/104063870101300304
- Sato, T., Okubo, T., Usui, M., Yokota, Si., Izumiyama, S., Tamura, Y. (2014). Asociación de uso veterinario de cefalosporinas de tercera generación con el riesgo de aparición de resistencia a cefalosporinas de espectro extendido en *Escherichia coli* de ganado lechero en Japón. *PLoS ONE* 9(4): e96101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096101>
- Scallan, E., Griffin, P. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Hoekstra, R. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United State-Major Pathogens *Emerg Infect Dis.*, 17(1): 16-22. [10.3201/eid1701.p11101](https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101)
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Mahon, B. E., Jones, T. F., Griffin, P. M. (2015). An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiol Infect.* 143(13):2795-804. doi: 10.1017/S0950268814003185.
- Schild, C. (2017). Estimación de la tasa de mortalidad anual de terneros y caracterización de los sistemas de crianza en establecimientos lecheros de Uruguay (Tesis de Maestría). Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.
- Seo, K.W., Lee, Y. J. (2020). The occurrence of CTX-M-producing *E. coli* in the broiler parent stock in Korea. *Microbiology and Food Safety.* 100(2):1008-1015 <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.005>
- Silva, C., Betancor, L., García, C., Astocondor, L., Hinojosa, N., Bisio, J. Rivera, J., Perezgasga, Pérez, L. V., Yim, E. L., Jacobs, J., García-del Portillo, F., Chabalgoity, J. A., Puente, J. L. (2017). Caracterización de aislamientos de *Salmonella enterica* causantes de bacteriemia en Lima, Perú, utilizando múltiples métodos de tipificación. *PLoS ONE* 12(12): e0189946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189946>
- Suárez, C., Gudiol, F. (2009). Beta-lactam Antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 27(2): 116-129. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.12.001
- Sugawara, M., Komori, J., Kawakami, M., Izumiya, Watanabe, H., Akiba, M (2011). Molecular and Phenotypic Characteristics of CMY-2 β -Lactamase-

- Producing Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolated from Cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73(3): 345–349.
- Tafur, M. (2009). La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22 (3), 330-338. Recuperado el 21 de julio de 2022, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902009000300009&lng=en&tlng=es
- Tang, L., Zhu, SL, Fang, X., Li, YG, Poppe, C., Johnston, RN, ...&Liu, SL (2019). Distintos orígenes evolutivos de fenotipos comunes de resistencia a múltiples fármacos en *Salmonella typhimurium* DT104: un proceso convergente para la adaptación bajo estrés. *Genética Molecular y Genómica*, 294 (3), 597-605.
- Tascini, C., Sozio, E., Viaggi, B., & Meini, S. (2016). Reading and understanding an antibiogram. *Italian Journal of Medicine*, 10(4), 289–300. Retrieved from <https://doi.org/10.4081/itjm.2016.794>
- Threlfall, E.J. (2000). Epidemia de *Salmonella typhimurium* DT 104: un verdadero clon multiresistente internacional, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46:7-10
- Torres, C., Zarazaga, M. (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25(2): 29-37. [10.1016/S0210-5705\(09\)71003-9](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(09)71003-9)
- Umpiérrez, A. (2016) Identificación y caracterización de *Escherichia coli* asociada a la diarrea neonatal de terneros en Uruguay. [Tesis de doctorado, Universidad de la República Uruguay].
- Ung A., Baidjoe, A. Y., Van Cauteren, D., Fawal, N., Fabre, L., Guerrisi, C., Danis, K., Morand, A., Donguy, M. P., Lucas, E., Rossignol, L., Lefèvre, S., Vignaud, M. L., Cadel-Six, S., Lailier, R., Jourdan-Da Silva, N., Le Hello, S. (2019) Disentangling a complex nationwide *Salmonella* Dublin outbreak associated with raw-milk cheese consumption, France, 2015 to 2016 *EuroSurveill.* 24 (3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1700703.
- Urquiza, G., Arce, J, Alanoca, G. (2018). Resistencia Bacteriana por Beta Lactamasas de Espectro Extendido: un problema creciente. *Revista Médica La Paz*, 24(2), 77-83. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582018000200012&lng=es&tlng=es.
- Van Boeckel, T. P., Glennon, E. E., Chen, D., Gilbert, M., Robinson, T. P., Grenfell, B. T., ... Laxminarayan, R. (2017). Reducing antimicrobial use in food animals. *Science* (New York, N.Y.), 357(6358), 1350–1352. doi:10.1126/science.aao1495
- Veling, J., Barkema, HW., Van Der Schans, J., Van Zijderveld, F., Verhoeff, J. (2002) Herd-level diagnosis for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin infection in bovine dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 53, 31-42

- Vignoli, R., Cordeiro, N. F., García, V., Mota, M. I., Betancor, L., Power, P., Chabalgoity, J. A., Schelotto, F., Gutkind, G., Ayala, J. A. (2006). New TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* serovar derby isolates from Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(2):781-4. doi: 10.1128/AAC.50.2.781-784.2006.
- Vignoli, R., Cordeiro, N., Seija, V., Schelotto, F., Radice, M., Ayala, J., Power, P., Gutkind, G. (2006). Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Revista argentina de microbiología*, 38(2), 84-88 http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412006000200009&lng=es&tlng=es.
- Vila, J., Marco, F. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 28(10):726–736. doi:10.1016/j.eimc.2010.05.001
- Villegas, M. V., Kattan, J. N., Quinteros, M. G., Casellas, J. M. (2008). Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 154-158.
- Wang, J., Xue, K., Yi, P., Zhu, X., Peng, Q., Wang, Z., Peng, Y., Chen, Y., Robertson, I.D., Li, X., Guo, A., Aleri, J.W. (2020). "Un estudio basado en un matadero on the Prevalence of *Salmonella* Fecal Carriage and ESBL Related Antimicrobial Resistance from Eliminated Adult Dairy Cows in Wuhan, China" *Pathogens* 9, no. 10: 853. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100853>
- Wattiau P, Boland C, Bertrand S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Appl Environ Microbiol.* 77(22):7877-85. doi: 10.1128/AEM.05527-11
- Wong, M. H. Y., Yan, M., Chan, E. W. C., Biao, K., Chen, S. (2014). Emergence of clinical *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates with concurrent resistance to ciprofloxacin, ceftriaxone, and azithromycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3752-3756.
- World Bank Group. (2017) Drug-Resistance Infection: A threat to our economic future. Final report. The World Bank, Washington DC, USA. 172 pg. <http://documents.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/pdf/final-report.pdf>
- Yanestria, S. M., Rahmaniari, R. P., Wibisono, F. J., Effendi, M. H. (2019). Detection of *invA* gene of *Salmonella* from milkfish (*Chanos*) at Sidoarjo wet fish market, Indonesia, using polymerase chain reaction technique. *Vet World*. 12(1):170-175. doi: 10.14202/vetworld.2019.170-175.

- Yukawa, S., Tamura, Y., Tanaka, K., Uchida, I. (2015). Rapid detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 strains by the polymerase chain reaction. *Acta Vet Scand* 57:59
- Zahedi, A & Samadi H (2015). Colistina, mecanismos y prevalencia de la resistencia, *Current Medical Research and Opinion*, 31:4, 707-721, DOI: 10.1185/03007995.2015.1018989
- Zhao, E. Y., Bao, H. X., Tang, L., Zou, Q. H., Liu, W. Q., Zhu, D. L., Chin, J., Dong, Y. Y., Li, Y. G., Cao, F. L., Poppe, C., Sanderson, K. E., Johnston, R. N., Zhou, D., Liu, G. R., Liu, S. L. (2013). Genomic comparison of *Salmonella typhimurium* DT104 with non-DT104 strains. *Mol Genet Genomics* 288:549–557

11- Anexo

Anexo I. Resultados obtenidos PCR multiplex para tipificación de los aislamientos de *Salmonella enterica*.

Cepa	Resultado PCR			Predicción serovar	Serovar antisueros
	Ag O	Ag H1	Ag. H2		
S1	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S2	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S3	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S4	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S5	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S6	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S7	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S8	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S9	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S10	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S11	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S12	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S13	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S14	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S15	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S16	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S17	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S18	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S19	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S20	7	-	-	-	Montevideo
S21	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S22	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S23	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S24	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S25	7	-	-	-	Montevideo
S26	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S27	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S28	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S29	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S30	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S31	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S32	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S33	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S34	9	G/Sdf-1	-	Enteritidis	Enteritidis
S35	9	G/Sdf-1	-	Enteritidis	Enteritidis
S36	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S37	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S38	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S39	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S40	9	G	-	Dublin	Dublin

S41	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S42	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S45	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S46	9	G	-	Dublin	Dublin
S47	9	G	-	Dublin	Dublin
S48	9	G	-	Dublin	Dublin
S49	9	G	-	Dublin	Dublin
S50	9	G	-	Dublin	Dublin
S51	9	G	-	Dublin	Dublin
S52	7	-	-	-	Montevideo
S53	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S54	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S55	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S56	3,10	Iv	1,7	Give	Give
S57	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S58	7	-	-	Montevideo	Montevideo
S59	3,10	Iv	1,7	Give	Give
S60	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S61	3,10	eh	1,6	Anatum	Anatum
S62	7	-	-	-	Montevideo
S63	7	-	-	-	Montevideo
S64	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S65	9	G	-	Dublin	Dublin
S66	9	G/Sdf-1	-	Enteritidis	Enteritidis
S67	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S68	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S69	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S70	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S71	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S72	9	G	-	Dublin	Dublin
S73	9	G	-	Dublin	Dublin
S74	3,10	-	-	-	Anatum
S75	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S76	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S77	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S78	3,10	eh	1,6	Anatum	Anatum
S79	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S80	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S81	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S82	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S84	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S85	4	I	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S87	3,10	eh	1,6	Anatum	Anatum
S88	O:9	G	-	Dublin	Dublin
S89	O:9	G	-	Dublin	Dublin
S90	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S91	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S93	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium

S94	O:9	G	-	Dublin	Dublin
S96	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S97	9	G	-	Dublin	Dublin
S98	9	G	-	Dublin	Dublin
S99	9	G	-	Dublin	Dublin
S100	9	G	-	Dublin	Dublin
S101	9	G	-	Dublin	Dublin
S103	9	G	-	Dublin	Dublin
S104	9	G	-	Dublin	Dublin
S105	9	G	-	Dublin	Dublin
S108	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S115	3,10	eh	1,6	Anatum	Anatum
S116	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S117	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S118	3,10	eh	1,6	Anatum	Anatum
S119	9	G	-	Dublin	Dublin
S120	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S121	4	i	1,2	Typhimurium	Typhimurium
S122	-	i	-	-	Typhimurium

Ag: antígenos, O: antígenos somáticos, H1: antígeno flagelar 1, H2: flagelar 2

Anexo II. Patrones de resistencia fenotípica en disco y CIM de los 107 aislamientos.

Patrones de Resistencia Disco	Nº	Patrones de Resistencia MIC	Nº
-	7	-	52
S-	30	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR-	10
TE-S-	13	COL-	7
K-S-	6	AMP-A/S2-MIN-	3
AMP-TE-K-S-	4	MIN-	3
CN-K-S-	4	FUR-	2
CIP-	3	FOX-	2
CIP-TE-ENR-S-	2	AMP-A/S2-AMI-LEVO-CIP-MIN-COL-SXT-NAL-	1
CIP-TE-S-	2	AMP-A/S2-P/T4-CIP-MIN-CHL-NAL-	1
TE-	2	AMP-A/S2-LEVO-CIP-MIN-CHL-NAL-	1
AK-S-	1	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR-COL-	1
AMP-AMC-CIP-CN-SXT-TE-K-S-	1	AMI-LEVO-CIP-COL-FOS-NAL-	1
AMP-AMC-CIP-NA-CN-C-TE-K-ENR-	1	AMP-LEVO-CIP-MIN-COL-NAL-	1
AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-	1	AMP-A/S2-SXT-CHL-	1
AMP-AMC-CTX-CAZ-CIP-C-S-	1	AMP-FOT-A/S2-FEP-FUR-AUG2-	1
AMP-AMC-CTX-CAZ-CN-K-S-	1	AMP-AMI-LEVO-CIP-	1
AMP-AMC-CTX-K-S-	1	AMI-CIP-COL-	1
AMP-AMC-CTX-S-	1	MIN-SXT-CHL-	1
AMP-AMC-TE-K-S-	1	AMP-MIN-CHL-	1
AMP-CIP-NA-SXT-TE-ENR-	1	AMP-A/S2-MIN-AUG2-	1
AMP-CN-C-SXT-TE-S-	1	AMP-A/S2-	1
AMP-CN-K-AK-S-	1	AMI-LEVO-CIP-SXT-NAL-	1
AMP-CN-K-S-	1	AMP-MIN-	1
AMP-CTX-CAZ-K-S-	1	CIP-COL-NAL-	1
AMP-CTX-K-S-	1	MIN-SXT-	1
AMP-ENR-	1	CIP-AUG2-	1
AMP-S-	1	SXT-CHL-	1
AMP-TE-	1	AMP-FOT-	1
CAZ-CIP-NA-ENR-AK-	1	A/S2-MIN-	1
CIP-CN-K-AK-S-	1	AMP-A/S2-	1
CIP-CN-TE-S-	1	LEVO-MIN-	1
CIP-NA-CN-K-S-	1	CIP-	1
CIP-NA-S-	1	CHL-	1
CIP-NA-TE-ENR-S-	1	AUG2-	1
CIP-NA-TE-S-	1	A/S2-	1
CIP-S-	1		
CN-K-AK-S-	1		
CN-S-	1		
CN-TE-K-S-	1		

C-SXT-TE-K-S-	1
ENR-S-	1
NA-C-TE-S-	1
NA-S-	1
TE-ENR-S-	1

N: numero, MIC: concentración inhibitoria mínima

Anexo III: Numero de clases de antibióticos resistentes de los 107 aislamientos de *Salmonella*.

Nº de clases	Disco	MIC
0	7	52
1	38	18
2	34	10
3	14	9
4	8	14
5	3	3
6	3	0
7	0	1

MIC: concentración inhibitoria mínima

Anexo IV: Patrones de resistencia en disco de los aislamientos positivos al gen *ST104*

AISLAMIENTO	PERFIL DISCO	ST 104
S1	CIP-NA-TE-S-	+
S2	CIP-TE-ENR-S-	+
S3	TE-ENR-S-	+
S4	TE-S-	+
S5	TE-S-	+
S6	CIP-TE-S-	+
S7	S-	+
S8	CIP-CN-TE-S-	+
S10	CIP-TE-ENR-S-	+
S11	CIP-NA-TE-ENR-S-	+
S12	TE-S-	+
S13	TE-S-	+
S14	TE-S-	+
S15	AMP-S-	+

S16	AMP-TE-K-S-	+
S17	TE-S-	+
S18	CIP-TE-S-	+
S19	TE-S-	+
S21	CIP-S-	+
S22	TE-	+
S23	S-	+
S24	C-SXT-TE-K-S-	+
S26	S-	+
S27	K-S-	+
S28	TE-S-	+
S29	S-	+
S32	S-	+
S36	CIP-	+
S37	-	+
S38	AK-S-	+
S39	CIP-CN-K-AK-S-	+
S41	-	+
S54	S-	+
S55	AMP-CN-C-SXT-TE-S-	+
S69	S-	+
S116	AMP-TE-	+
S117	S-	+
S120	CAZ-CIP-NA-ENR-AK-	+
S121	TE-S-	+

ST 104: gen para detectar *Salmonella* Typhimurium DT104

