



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS:

"DETERMINANTES GENÉTICOS DE LA RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS
EN CEPAS DE *Salmonella enterica* AISLADAS DE ALIMENTOS EN
MICHOACÁN DURANTE 2008-2015"

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:
QFB ELDA ARACELI HERNÁNDEZ DÍAZ



Director de tesis:

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

Morelia, Michoacán. Agosto, 2018

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo. El trabajo se llevó a cabo con la colaboración del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán. Se contó con el apoyo para el proyecto titulado “Determinantes genéticos de la resistencia a Betalactámicos en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos en Michoacán durante 2008-2015” del Fondo Mixto CONACyT-Gobierno del Estado de Michoacán. Se agradece también al CONACyT la beca otorgada para la realización de estudios de Maestría con el número de registro 596085.

AGRADECIMIENTOS

Dad gracias en todo...

Primeramente, gracias a Dios, quien es el que permitió que pudiera ser partícipe de esta aventura.

Gracias a mi familia por su apoyo incondicional, a mis padres Elda y José Luis y a mi hermano Luis Daniel.

A cada uno de mis compañeros en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, a los doctores Gerardo y Soledad, así como a cada uno de mis sinodales.

Agradezco a mis compañeros de generación sin los que este camino hubiera sido más difícil de transitar.

Finalmente, doy gracias a aquellas personas que me han brindado su amistad a través de los años, porque siguen estando conmigo a pesar de todo y que me han permitido compartir este proceso en todas sus vertientes y con todas sus aristas...Gracias Héctor, Irving y Gerado.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
LISTADO DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Género <i>Salmonella</i>	1
1.2 Epidemiología	2
1.2.1 Enfermedades de transmisión alimentaria	2
1.2.2 Salmonelosis	3
1.3 Resistencia a antibióticos	5
1.3.1 Definición de resistencia	5
1.3.2 Tipos de resistencia	6
1.3.3 Mecanismos de resistencia	6
1.3.4 Descripción de la situación mundial	8
1.4 Antibióticos β -lactámicos	10
1.4.1 Clasificación y estructura química	11
1.4.2 Características farmacodinámicas	14
1.4.3 Mecanismo de acción	14
1.4.4 Espectro de acción	16
1.4.5 Resistencia a β -lactámicos	17
1.5 Clasificación de las betalactamasas	18
1.6 Betalactamasas de espectro extendido	19
1.7 Carbapenemasas	20
1.7.1 Serín-Carbapenemasas	21
1.7.2 Metalocarbapenemasas	21
1.8 Genes de resistencia	21
1.8.1 Genes de resistencia a β -lactámicos	22
1.9 Situación global de la resistencia a β -lactámicos	24
1.9.1 Estudios realizados en <i>Salmonella enterica</i>	26
1.10 Antecedentes en México	28
1.11 Antecedentes en el Laboratorio de Genética Molecular en Michoacán	30
2. JUSTIFICACIÓN	32
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. ESTRATEGIA	35

6. MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1 Material biológico	36
6.2 Cultivo de cepas	37
6.3 Extracción de ADN	37
6.4 Amplificación por PCR de los genes de resistencia	37
6.5 Análisis de resultados	38
7. RESULTADOS	40
7.1 Productos de amplificación por PCR	40
7.2 Distribución de los genes <i>bla</i> en cada Serotipo/Serogrupo de <i>Salmonella Enterica</i>	41
7.3 Distribución de genes <i>bla</i> en los alimentos de origen de las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	43
7.4 Distribución geográfica de los genes de resistencia <i>bla</i> en el estado de Michoacán	43
7.5 Distribución de los genes <i>bla</i> por año de aislamiento de las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	45
7.6 Relación entre la presencia de genes <i>bla</i> y la Resistencia fenotípica	46
7.7 Análisis estadístico	49
8. DISCUSIÓN	51
9. RESUMEN DE RESULTADOS	54
10. CONCLUSIÓN	55
11. REFERENCIAS	56
12. ANEXO A	63

LISTADO DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grado Celsius
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
AMPR	Aislados ampicilina resistente
BLEA	Betalactamasas de espectro ampliado
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
BOX	Elementos repetitivos en mosaico
CBM	Concentración bactericida mínima
CIM	Concentración inhibitoria mínima
dNTP	Desoxinucleótidos
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
FIFA	Federación Internacional de Fútbol Asociación
g	Gramos
h	Horas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
kb	kilobases
LB	Agar Luria Bertani
LESPM	Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán
M	Marcador de tamaño molecular
MBLs	Metalobetalactamasas
MDR	Multirresistencia
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
μM	Micromolar
mM	Milimolar
μl	Microlitro
ml	Mililitro
min	Minutos
NCBI	Centro Nacional de Información para Biotecnología
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas fijadoras de penicilina
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
PV	Perfil de virulencia
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SS	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>
SSA	Secretaría de Salud

ST	Secuencia tipo
SUIVE	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica
Tris-HCl	Tris-ácido clorhídrico
XDR	Resistencia extrema

ÍNDICE DE TABLAS

NUM.	TÍTULO	PÁGINA
1	Diagnósticos presuntivos de Enfermedades transmitidas por alimentos.	3
2	Estructura química de los antibióticos β -lactámicos.	13
3	Principales estudios realizados en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana en cepas de <i>S. enterica</i> .	30
4	Serotipo de las cepas analizadas de <i>S. enterica</i> .	36
5	Datos de resistencia a antibióticos.	37
6	Oligonucleótidos utilizados para la detección de los genes <i>bla</i> .	38
7	Condiciones específicas de las PCR para cada gen <i>bla</i> .	38
8	Serotipo/Serogrupo de <i>S. enterica</i> con un gen <i>bla</i> en una cepa.	41
9	Municipios de procedencia de las cepas con un solo gen <i>bla</i> .	44
10	Resistencia a familias de antibióticos no β -lactámicos.	48
11	Resistencia a β -lactámicos.	48
12	Resumen del procesamiento de los datos.	49
13	Resultados de las Pruebas de chi-cuadrada.	49
14	Relaciones estadísticamente significativas.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

NUM.	TÍTULO	PÁGINA
1	Clasificación general de <i>Salmonella enterica</i> .	2
2	Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas.	8
3	Etapas de formación de la pared celular bacteriana.	15
4	Mecanismo de acción de los β -lactámicos.	16
5	Distribución mundial de los diferentes tipos de metalobetalactamasas.	28
6	Productos de amplificación obtenidos para los genes <i>bla</i> en las cepas de estudio de <i>S. enterica</i> .	40
7	Distribución de la presencia de los genes <i>bla</i> en cepas de <i>S. enterica</i> .	41
8	Número de cepas de <i>S. enterica</i> portadoras de genes <i>bla</i> por Serotipo/Serogrupo.	42
9	Número de cepas de <i>S. enterica</i> portadoras de genes <i>bla</i> por Serotipo/Serogrupo.	42
10	Distribución de genes <i>bla</i> por cada alimento de origen.	43
11	Distribución geográfica de los genes <i>bla</i> de cepas de <i>S. enterica</i> del estado de Michoacán, periodo 2008-2015.	44
12	Municipios con mayor presencia de genes de resistencia a β -lactámicos.	45
13	Distribución de los genes <i>bla</i> por año de aislamiento de las cepas de <i>S. enterica</i> .	46
14	Resistencia fenotípica en relación con la presencia de genes <i>bla</i> .	47

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades gastrointestinales son un problema de salud pública mundial y causante de millones de muertes cada año. El género *Salmonella* causa cuadros gastrointestinales (salmonelosis) en animales y humanos, en especial *Salmonella enterica* subespecie enterica. La salmonelosis es una enfermedad de transmisión alimentaria para la cual no se recomienda tratamiento de rutina, pero en el caso de complicaciones en niños menores de tres años, ancianos y pacientes inmunocomprometidos se recomienda el uso de tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas y en caso de resistencia bacteriana a éstos, se usan los β -lactámicos. Los β -lactámicos son compuestos de acción bactericida lenta, que presentan escasa toxicidad y poseen un anillo β -lactámico. La resistencia a antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública. El principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos es la producción de betalactamasas, que hidrolizan el anillo β -lactámico lo que conduce a la pérdida de la actividad antibacteriana. Las betalactamasas son enzimas catalíticas cuya producción está controlada por un gen cromosómico o adquirido a través de elementos genéticos y mecanismos habituales de transferencia genética. Se han encontrado genes de resistencia a betalactámicos en ADN bacteriano de hace 30.000 años. El gen *bla_{TEM}* es uno de los genes de resistencia a betalactámicos más diseminados entre especies y geográficamente, mientras que *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{SPM}* han sido confinados a ciertas especies y ciertas regiones geográficas. **Objetivo:** Evaluar la presencia de determinantes genéticos *bla_{TEM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{GIM}* y *bla_{SPM}* en las cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos del estado de Michoacán, durante el periodo 2008-2015. **Material y Métodos:** 261 cepas de *Salmonella enterica*, obtenidas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán y serotipificadas por el esquema de Kauffmann-White por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Se cultivaron en medio líquido LB para la posterior extracción de ADN y amplificación de genes *bla* por la técnica de PCR. Se determinó la relación entre la resistencia a β -lactámicos y la presencia del determinante genético correspondiente, mediante la prueba no paramétrica chi cuadrada de Pearson (χ^2). Las cifras estadísticamente significativas fueron las que se asociaron a una $P < 0.05$. **Resultados:** De las 261 cepas analizadas, 121 (46%) no presentaron ninguno de los genes analizados, mientras que en 140 (54%) cepas se encontró al menos uno de los genes. De las 140 cepas estudiadas, el gen *bla_{TEM}* se encontró en 8 cepas, el gen *bla_{GIM}* se encontró en 22 cepas, el gen *bla_{SIM}* en 43 y el gen *bla_{SPM}* en 47 cepas. Se encontraron cepas que tuvieron más de un gen *bla*, para la combinación *bla_{GIM+SPM}* 8 cepas, 2 cepas presentaron *bla_{TEM+SPM}*, 4 cepas *bla_{SIM+SPM}* y *bla_{GIM+SIM+SPM}* en 6 cepas. Se obtuvo un valor de $\alpha < 0.05$ para la relación entre la presencia de alguno de los genes y la resistencia fenotípica. **Conclusión:** Los genes de resistencia a β -lactámicos se encontraron de forma muy variada en las cepas de estudio distribuidas en diversos alimentos y en una amplia área geográfica; además, en su mayoría han prevalecido a través del tiempo. Existe una relación positiva entre la presencia de los genes *bla* y la resistencia fenotípica mostrada por las cepas portadoras de dichos genes.

Palabras clave: genes, antibióticos, relación, enzimas, enterobacterias

ABSTRACT

Introduction: Gastrointestinal diseases are a problem of public health world and causing millions of deaths every year. Salmonellosis is a disease of food transmission for which routine treatment is not recommended, but for complications in children under three years of age, immunocompromised patients and elderly is recommended the use of tetracycline, quinolones, sulfonamides and in case of bacterial resistance to these, the β -lactams are used. The β -lactam compounds are slow bactericidal action, which have low toxicity and have a ring β -lactam. Resistance to antibiotics has become a public health problem. The main mechanism of β -lactam resistance is the production of beta-lactamases that hydrolyze ring β -lactam which leads to loss of antibacterial activity. The beta-lactamases are enzymes catalytic whose production is controlled by a gene chromosomal or acquired through genetic elements and common mechanisms of gene transfer. Beta-lactam resistance genes have been found in bacterial DNA from 30,000 years ago. Gene *bla*_{TEM} is one of the genes of resistance to beta-lactams more scattered among species and geographically, while *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} and *bla*_{SPM} have been confined to certain species and certain geographic regions. **Aim:** Evaluate the presence of genetic determinants *bla*_{TEM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM} and *bla*_{SPM} in strains of *Salmonella enterica* isolated from State food of Michoacan, during the period 2008-2015. **Material and methods:** 261 strains of *Salmonella enterica*, obtained by the State laboratory of public health for the State of Michoacan and serotipificadas by Kauffmann-White scheme by the Institute for diagnostic and reference Epidemiological. In liquid medium LB for the subsequent extraction of DNA and amplification of genes were grown *bla* for the PCR technique. It was determined the association between β -lactam resistance and the presence of the corresponding genetic determinant, using the non-parametric test (χ^2) Pearson Chi-square. The statistically significant numbers were those associated with a $P < 0.05$. **Results:** 261 strains analyzed, 121 (46%) did not present any of the analyzed genes, while 140 (54%) strains were found at least one of the genes. Of the 140 strains studied, *bla*_{TEM} gene was found in 8 strains, *bla*_{GIM} gene was found in 22 strains, gene *bla*_{SIM} in 43 and gene *bla*_{SPM} 47 strains. We found strains that had more than one gene for combination *bla*, *bla*_{GIM+SPM} 8 strains, 2 strains presented *bla*_{TEM+SPM}, 4 strains *SIM+SPM* *blah* and *bla*_{GIM+SIM+SPM} 6 strains. A value of $\alpha < 0.05$ for the association between the presence of some of the genes and phenotypic resistance is obtained. **Conclusion:** Resistance to β -lactam genes were found of varied shape of strains of study distributed in various foods and in a wide geographic area; In addition, they have mostly prevailed through time. There is a positive association between the presence of genes *bla* and the phenotypic resistance shown by strains carrying these genes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Género *Salmonella*

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un conjunto heterogéneo de bacilos Gram negativos de importancia clínica, con características estructurales semejantes y homología genética, pero heterogéneos en cuanto a su hábitat y capacidad patógena ⁽¹⁾.

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, ya que se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como también formando parte de la microbiota del tracto intestinal del ser humano y de los animales ⁽²⁾. Su ubicuidad y su frecuente adquisición de elementos genéticos móviles demuestran que sus hospedadores están expuestos regularmente a nuevas cepas con nuevo material genético (incluyendo resistencia antibiótica) a través del agua, los alimentos o los animales ⁽³⁾. Los miembros de esta familia son patógenos de importancia médica tanto para humanos como para animales. Los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* y ciertos patotipos de *Escherichia coli* y *Klebsiella rhinoscleromatis*, se consideran patógenos primarios porque siempre están asociados a enfermedad ^(2,4).

Salmonella es un género de bacilos Gram negativos, anaerobio-facultativos, generalmente de 2-5 micras de longitud por 0.5-1.5 micras de ancho, generalmente móviles por sus flagelos peritricios; tienen antígenos somáticos (O) que son lipopolisacáridos y antígenos flagelares (H) que son proteínas ⁽⁵⁾. La mayoría de los miembros de este género son fermentadores de lactosa, productores de sulfuro de hidrógeno, oxidasa negativos y catalasa positivos. Otra de sus propiedades bioquímicas incluye su habilidad para crecer con citrato como única fuente de carbono, descarboxilan lisina e hidrolizan urea ⁽⁴⁾.

Según el esquema clásico de Kauffman-White basado en antígenos somáticos, flagelares y ocasionalmente capsular (Vi), el género *Salmonella* se clasifica en 2,579 serotipos, que pueden ser móviles o inmóviles ⁽⁵⁾ (Fig. 1). Se divide en dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, tomando en cuenta sus características bioquímicas generales. Esta última se subdivide en seis subespecies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*; sin embargo, las de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* y *arizonae* ⁽⁶⁾.

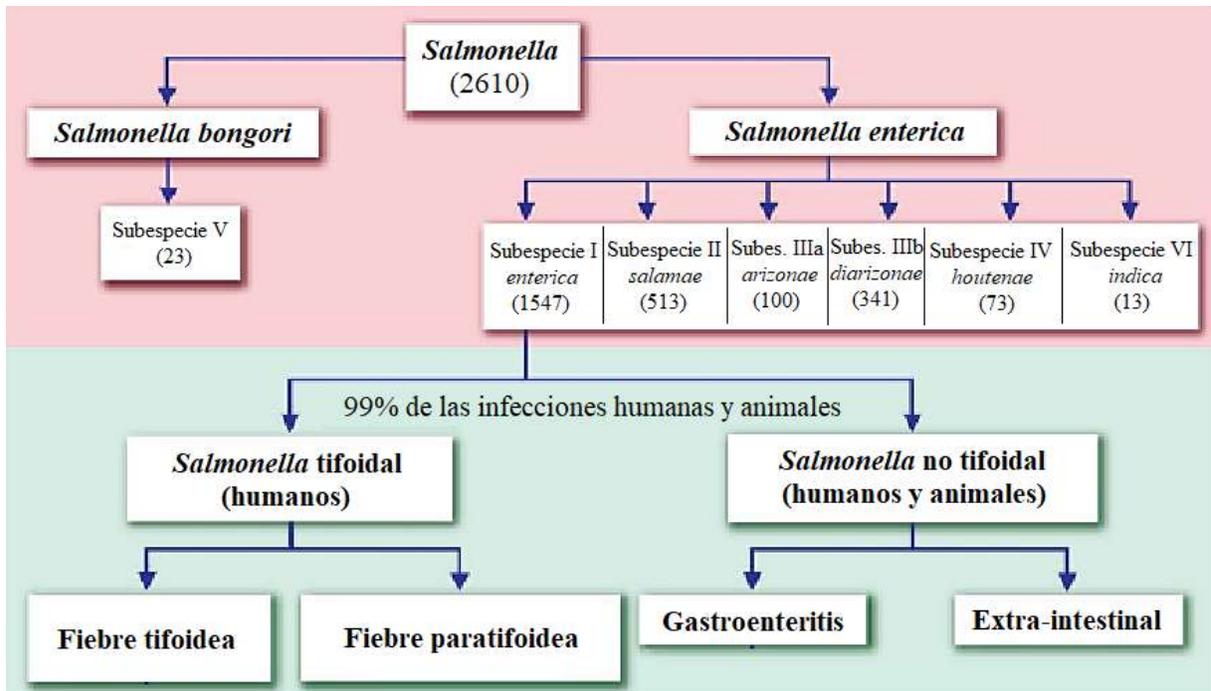


Fig. 1. Clasificación general de *Salmonella enterica*.

Los números entre paréntesis son el número de serotipos pertenecientes a cada subespecie ⁽⁷⁾.

1.2 Epidemiología

1.2.1 Enfermedades de transmisión alimentaria

Las enfermedades de transmisión alimentaria son un problema de salud pública mundial considerable, cada año aproximadamente una de cada 10 personas contrae alguna enfermedad de transmisión alimentaria y se pierden 33 millones de años de vida sana. Las enfermedades de transmisión alimentaria pueden ser graves, en especial cuando afectan a los niños pequeños. Los alimentos insalubres son la causa más común de las enfermedades diarreicas. Cada año enferman 550 millones de personas de diarreas, de las cuales 220 millones son niños menores de 5 años ⁽⁸⁾.

Las personas que viajan desde países desarrollados a otros en vías de desarrollo pueden sufrir una gastroenteritis durante el viaje o al regreso al país de origen (diarrea del viajero). La participación de los distintos microorganismos difiere de un área geográfica a otra. En cuanto al predominio estacional, hay mayor incidencia de gastroenteritis vírica en otoño-invierno; mientras que las bacterias afectan preferentemente en primavera-verano ⁽⁹⁾.

En México, la Secretaría de Salud (SSA) informó que desde el 2001 las enfermedades gastrointestinales ocasionadas por bacterias o parásitos ocupan continuamente la decimocuarta causa de fallecimientos en el nivel nacional, y que los estados con mayor incidencia son: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla, y el Distrito Federal. Tan solo en 2008, el Seguro Social brindó 2 000 188 consultas por enfermedades gastrointestinales, y los estados con mayor incidencia de estas infecciones fueron: Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero, y Oaxaca. De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera y rotavirus representan un problema severo de salud pública para nuestro país. Según lo reportado en los Boletines Epidemiológicos de México en los últimos 10 años, el grupo de edad más afectado es el que se halla entre los 25 y 44 años; le siguen los grupos de 1 a 4 años y los menores de 1 año ⁽⁹⁾.

Para el cierre de información del año 2016, el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), a través del Sistema de Vigilancia Convencional muestra los diagnósticos presuntivos para las enfermedades de transmisión alimentaria, entre los que podemos ver 113 951 casos generados por el género *Salmonella* (Fiebre tifoidea + Otras salmonelosis) (Tabla. 1) ⁽¹⁰⁾.

Tabla 1. Diagnósticos presuntivos de Enfermedades transmitidas por alimentos			
Padecimiento	Casos	Padecimiento	Casos
Amebiasis intestinal	219 977	Infecciones intestinales por otros organismos	4 454 552
Ascariasis	42 668	Intoxicación alimentaria bacteriana	25 858
Brucelosis	2 402	Otras helmintiasis	162 458
Enteritis debida a rotavirus	1 234	Otras infecciones intestinales debidas a protozoarios	59 808
Enterobiasis	8 999	Otras salmonelosis	77 566
Fiebre tifoidea	36 385	Shigelosis	3 673
Giardiasis	10 767	Teniasis	133
Hepatitis vírica A	7 728	Triquinosis	8
Total (diagnósticos presuntivos)			5 114 213

1.2.2 Salmonelosis

Salmonella enterica es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas a nivel mundial y es el principal agente causal del cuadro clínico conocido como salmonelosis, la cual es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente

extendidas. Cada año provoca decenas de millones de casos en todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones. La mayoría de los casos de salmonelosis son leves, aunque, en ocasiones la enfermedad puede causar defunción ^(11, 12).

La salmonelosis en México constituye una de las causas más comunes de gastroenteritis en bebés y niños. En México se reportan los casos de paratifoidea y otras salmonelosis de manera conjunta. Con respecto a la morbilidad en 2003, la paratifoidea y otras salmonelosis ocuparon el vigésimo cuarto lugar dentro de todas las causas de enfermedades, con 103 815 casos. En 2008, ocupó el décimo noveno lugar, con 122 422 casos. Los estados en los que se ha reportado el mayor número de casos son: Tabasco, Chiapas, Coahuila, Sinaloa y Veracruz. Con respecto al sexo, en 2008, el mayor porcentaje de casos correspondió a mujeres, con 67% ⁽⁹⁾. La gravedad de la enfermedad depende de factores propios del hospedero y de la cepa de *Salmonella* en cuestión ^(11, 12).

Salmonella puede sobrevivir varias semanas en un entorno seco y varios meses en el agua. Por lo general estas cepas causan gastroenteritis, que suele ser un trastorno sin complicaciones y no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en los niños, los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos. Generalmente, se caracteriza por fiebre alta, dolor abdominal, diarrea, náusea y, a veces, vómitos. Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre 6 y 72 h (generalmente 12 a 36 h) después de la ingesta de alimentos contaminados con *Salmonella*, y la enfermedad dura entre 2 y 7 días. En la mayoría de los casos, los síntomas de salmonelosis son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico. Sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños pequeños y en ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro la vida. Si bien los grandes brotes de *Salmonella* atraen la atención de los medios informativos, entre el 60 y el 80% de los casos no se reconocen como parte de un brote identificado y se clasifican como casos esporádicos, o ni siquiera se diagnostican ^(11, 12).

La bacteria *Salmonella* es prevalente en animales comestibles tales como aves, porcinos y vacunos, por lo que son importantes en la diseminación de la enfermedad causando intoxicación alimentaria humana, además, estos animales pueden estar infectados, pero no mostrar enfermedad clínica ^(11, 12).

Las personas contraen la salmonelosis a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal (principalmente huevos, carne, aves y leche), aunque también

otros alimentos se han vinculado a la transmisión, incluidas hortalizas contaminadas por estiércol ^(11, 12).

En los casos graves el tratamiento es sintomático y consiste en la reposición de los electrolitos perdidos a raíz de los vómitos y la diarrea (mediante el suministro, por ejemplo, de iones de sodio, potasio y cloruro) y la rehidratación ^(11, 12).

La terapia antimicrobiana sistemática no está recomendada para casos leves o moderados en personas sanas. Esto se debe a que los antimicrobianos podrían no eliminar completamente la bacteria y seleccionar cepas resistentes, con lo cual el fármaco se volvería ineficaz. Sin embargo, los grupos de riesgo, especialmente los lactantes, los ancianos y los pacientes inmucomprometidos, podrían necesitar tratamiento antimicrobiano, lo más común es que los especialistas recomienden el uso de trimetoprim-sulfametoxazol, amoxicilina-clavulánico, ciprofloxacino o algún miembro de la familia de las cefalosporinas en casos complicados o resistentes. Los antimicrobianos se administran también si la infección se propaga desde el intestino a otras partes del organismo. En vista de la creciente resistencia global a los antimicrobianos, las directrices de tratamiento se deberían revisar periódicamente teniendo en cuenta los patrones de resistencia de la bacteria ^(11, 12).

1.3 Resistencia a antibióticos

1.3.1 Definición de resistencia

La resistencia bacteriana se define como la capacidad de una bacteria para crecer en una concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de otras bacterias de su misma especie ⁽¹³⁾.

Las definiciones de resistencia se clasifican según el número y la clase de antibióticos implicados: La multirresistencia (MDR) se define como la ausencia de sensibilidad a por lo menos un fármaco en tres o más de las categorías de antibióticos. La resistencia extrema (XDR) se refiere a la ausencia de sensibilidad a por lo menos, un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto en dos de ellas o menos. La resistencia a todos los antimicrobianos se define como resistencia a todas las categorías de antibióticos ⁽¹⁴⁾.

1.3.2 Tipos de resistencia

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un tema amplio, que puede ser considerado desde distintos ángulos.

Resistencia individual: se refiere a la interacción molecular entre una célula bacteriana con todo su arsenal genético y metabólico, y un antibiótico determinado. Al referirnos a arsenal genético y metabólico es importante señalar que no siempre es suficiente con que el microorganismo posea un gen que codifica un mecanismo de resistencia en particular, ya que ese gen o esos genes deben ser expresados en cantidad y calidad suficiente y muchas veces deben interactuar distintos mecanismos de resistencia para alcanzar la sobrevivencia bacteriana⁽¹⁵⁾.

Resistencia poblacional: representa el comportamiento *in vitro* de un inóculo bacteriano preestablecido (una población bacteriana) enfrentado a determinada concentración de un antibiótico, por un período de tiempo determinado. Estos son los tipos de estudios que en general se realizan en el laboratorio clínico. Los resultados finales de estos estudios dan un informe de sensibilidad o resistencia, para la orientación terapéutica del paciente, pero que no siempre coinciden con el éxito terapéutico⁽¹⁵⁾.

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, mientras que la resistencia adquirida es aquella que puede presentarse entre cepas de especies que por lo general son sensibles, pero desarrollan resistencia por mutación o transferencia genética lateral, proceso por medio del cual un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente^(16, 17, 18, 19, 13). La resistencia adquirida puede ser de origen extracromosómico debido a elementos genéticos ajenos al cromosoma bacteriano: plásmidos, transposones e integrones, los cuales pueden transferirse de una bacteria a otra con relativa frecuencia^(20,21).

1.3.3 Mecanismos de resistencia

La gran mayoría de los mecanismos de resistencia pueden agruparse en tres categorías (Fig. 2).

- a) Inactivación enzimática: el principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones⁽¹⁵⁾.

- b) Modificaciones en el sitio blanco: existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo, tales como modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico, y la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales ⁽¹⁵⁾.
- c) Alteraciones de la permeabilidad:
- Alteraciones de las membranas bacterianas: se ve fundamentalmente en Gram negativos, donde la membrana externa es impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias quedan restringidas a la penetración a través de proteínas transmembrana con función de porinas. La disminución de la expresión de dichas porinas puede disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico ⁽¹⁵⁾.
 - Aumento de la salida de antibióticos: la resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico. En Gram negativos estos sistemas en general se encuentran constituidos por tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa. Estos sistemas así constituidos exportan moléculas desde el citoplasma hacia fuera de la membrana externa. En Gram positivos se trata de una proteína transmembrana con función de ATPasa que actúa como bomba de eflujo ⁽¹⁵⁾.

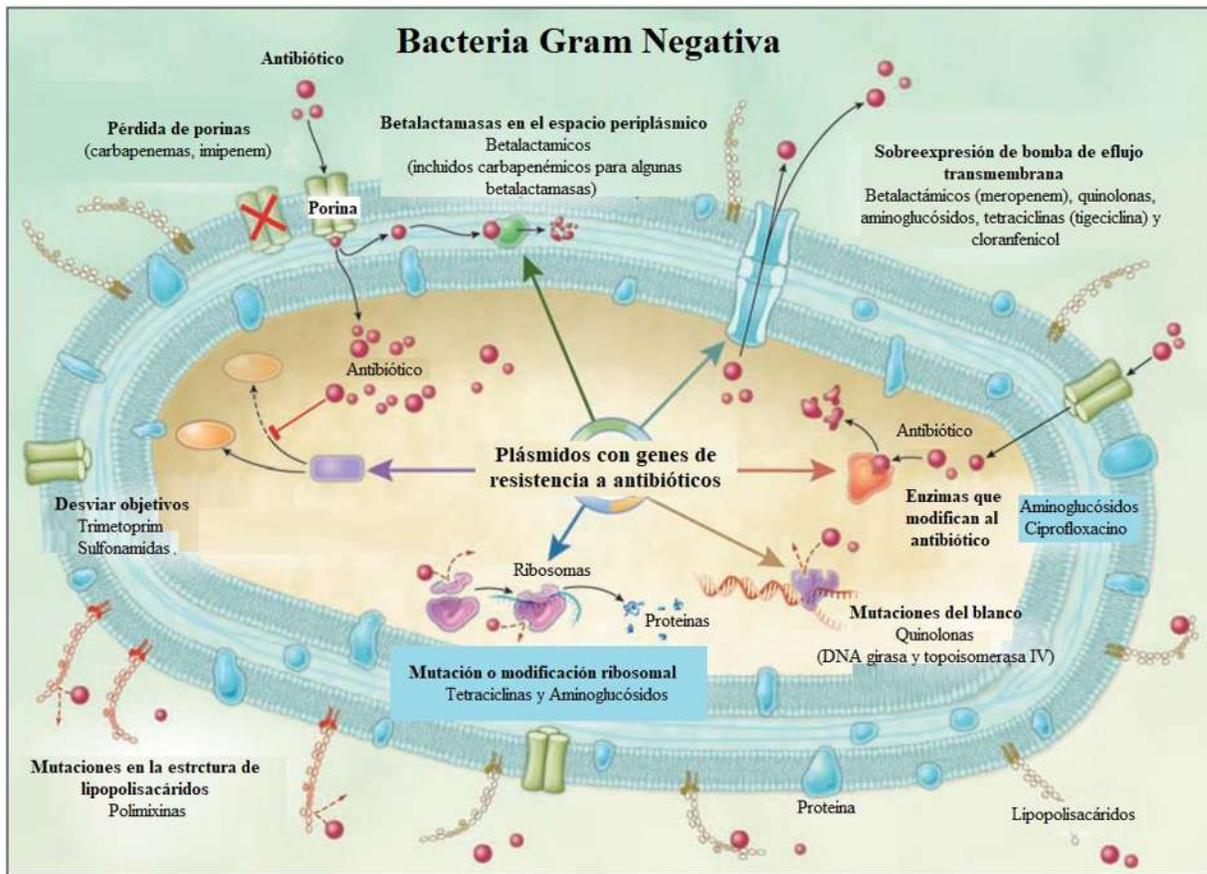


Fig. 2. Mecanismos de resistencias en bacterias Gram negativas ⁽²²⁾.

1.3.4 Descripción de la situación mundial

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica supuso una de las intervenciones más importantes para el control de enfermedades, sin embargo, desde hace ya no pocos años, la resistencia bacteriana a ellos ⁽²³⁾ representa una amenaza creciente que genera un problema de amplias dimensiones y un desafío terapéutico. La resistencia antimicrobiana ha sido reconocida por la OMS como una de las mayores amenazas para la salud humana ⁽²⁴⁾ porque la rapidez con que surgen los microorganismos multirresistentes no es igual a la velocidad con que surgen nuevos antibióticos ⁽²⁵⁾.

A lo largo de la historia se ha visto un aumento significativo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, efecto que ha generado gran preocupación porque se da lugar a fallos terapéuticos en tratamientos, así como al riesgo de la transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre o de genes portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas ^(26, 27).

Esta resistencia se manifiesta con el uso de antimicrobianos, pero claramente se acelera e intensifica con el mal uso y abuso, cuando se exponen bacterias a estos agentes en forma innecesaria, prolongadamente o en dosis subterapéuticas, con lo que se desencadenan los mecanismos genéticos de resistencia y se traspasan estas propiedades entre las bacterias ⁽²⁸⁾.

Lo importante a destacar, es que incluso en la terapia antibiótica clínicamente adecuada, el antibiótico selecciona bacterias resistentes en la microbiota del individuo tratado y en su entorno ⁽²⁹⁾.

De manera frecuente se reporta resistencia bacteriana a nuevos antibióticos, tanto en bacterias Gram negativas como en bacterias Gram positivas ⁽³⁰⁾.

Si al poco de introducirse la penicilina en la práctica clínica la gran mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran sensibles, actualmente lo son menos del 5-10%. Cuando se introdujo en la clínica la cefotaxima todas las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* eran sensibles; hoy son resistentes el 13 y el 16%, respectivamente ⁽²³⁾.

De este modo, desde los años 50 hasta la actualidad no ha cesado de aumentar la cantidad de descripciones de microorganismos que han adquirido alguna forma de resistencia contra uno o más antibióticos. Inicialmente se monitorizó la evolución de las resistencias a antimicrobianos en los aislamientos originados en la clínica humana y posteriormente se dio gran importancia a la necesidad de la monitorización en los aislamientos de origen animal. Se ha prestado escasa atención a la presencia de bacterias resistentes en los alimentos destinados a consumo humano, especialmente en los de origen animal y que presumiblemente pueden ser portadores de resistencias ⁽³¹⁾.

La capacidad de las bacterias de eludir la acción antibacteriana es utilizada por algunos microorganismos como mecanismo de defensa; es un fenómeno que existía antes del descubrimiento de los antibióticos y de su uso ⁽¹⁹⁾.

La resistencia de las bacterias Gram negativas de importancia clínica a los antibacterianos se presenta fundamentalmente en la familia *Enterobacteriaceae* y en bacilos Gram negativos no fermentadores ⁽³²⁾.

Las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y costo del tratamiento que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie. En Europa en 2007 se calcularon 400.000 infecciones por bacterias multirresistentes y

25.000 muertes atribuibles. En Estados Unidos las bacterias multirresistentes infectan a unos 2 millones de personas al año, de las que al menos 23.000 mueren ⁽²³⁾.

El costo anual para el sistema de salud de EE.UU. de las infecciones resistentes a los antibióticos oscila entre US \$21 y \$34 billones y más de US\$8 millones adicionales por costos de hospitalización ⁽²⁴⁾.

El caso de las bacterias Gram negativas resistentes es aún más alarmante, sobre todo por la aparición y rápida propagación de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) a nivel mundial que amenaza a los β -lactámicos más activos, los carbapenemas. Por ejemplo, la aparición de EPC antes de 2010 era infrecuente en la Comunidad de Madrid, pero solo hasta junio de 2013 el número de hospitales en los que se identificaron casos de enterobacterias productoras de carbapenemasas OXA-48 llegó a 11 ⁽²³⁾. La producción de carbapenemasas no es el único mecanismo de resistencia a los carbapenemas, pero es el más frecuente y relevante para la salud, porque cuando una persona está infectada con una EPC no es infrecuente que queden muy pocas alternativas terapéuticas ⁽³³⁾.

En muchos países se ha observado una alta proporción de cepas de *Salmonella* con resistencia múltiple a los antibióticos, siendo *S. Typhimurium* la serovariedad más conocida como multirresistente ⁽³⁴⁾.

La resistencia bacteriana a los antibióticos que más preocupa a los médicos responsables del diagnóstico y tratamiento de una infección es la llamada resistencia adquirida ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾.

1.4 Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos son sustancias producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetes), que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente pueden destruirlos. El uso común ha extendido el término de antibiótico a agentes antibacterianos sintéticos ⁽³⁵⁾.

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva. El objetivo de la antibioticoterapia es

controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de estos ⁽³⁶⁾.

De acuerdo con la interacción bacteria-antibiótico se clasifican en dos categorías principales las cuales son: 1) Bactericidas: su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana (β -lactámicos, Aminoglucósidos, Glicopéptidos, Quinolonas y Fosfocina), y 2) Bacteriostáticos: impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruir las células (Sulfamidas, Clindamicina, Macrólidos, Tetraciclina y Cloranfenicol) ⁽³⁶⁾.

Los β -lactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintéticos que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo β -lactámico. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gram negativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina sigue siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones clásicas, las cefalosporinas lo son en la profilaxis quirúrgica y en infecciones comunitarias graves, las carbapenemas en infecciones nosocomiales mixtas y por bacterias multirresistentes, y los inhibidores de betalactamasas permiten el uso eficaz de las amino y ureido penicilinas en infecciones de gran relevancia ⁽³⁷⁾.

1.4.1 Clasificación y estructura química

La presencia del anillo β -lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos. Además, éste determina el mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa (actúa sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula eucariota animal) y el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas) de esta gran familia de antibióticos. El anillo β -lactámico consiste en un anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno, no obstante, para que el β -lactámico sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del

compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas (Tabla 2) ^(35, 38, 39).

a) Penicilinas: son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que consiste en un anillo β -lactámico unido a un anillo tiazolidínico. Además, tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo β -lactámico y que es la que define sus propiedades. Los compuestos de origen natural son producidos por diferentes especies de *Penicillium spp* ⁽³⁷⁾.

De acuerdo con su origen y espectro de acción pueden clasificarse en: penicilinas naturales (G y V), penicilinas resistentes a las penicilinasas estafilocócicas (oxacilina, meticilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), y ureidopenicilinas (piperacilina) ⁽³⁵⁾.

b) Cefalosporinas: son productos de origen natural derivados de productos de la fermentación de *Cephalosporium acremonium*. Son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem que consiste en un núcleo formado por un anillo β -lactámico unido a un anillo de dihidrotiazino. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las cuatro generaciones de cefalosporinas conocidas ^(35,37).

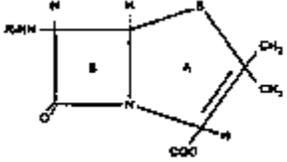
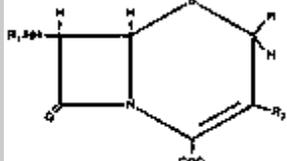
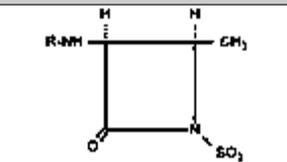
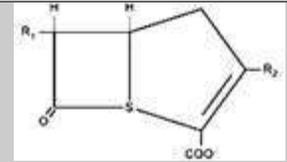
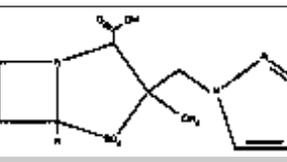
c) Monobactámicos: tienen una estructura β -lactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo β -lactámico no está fusionado a otro secundario ⁽³⁷⁾.

d) Carbapenémicos: consisten en un anillo β -lactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condiciona la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas, siendo los β -lactámicos de más amplio espectro y actividad ^(37, 40).

Imipenem fue el primer carbapenem desarrollado para uso clínico. Es un derivado semisintético producido por *Streptomyces spp*. Otros compuestos más modernos son meropenem y ertapenem. Aztreonam es el único monobactámico disponible para uso clínico ⁽³⁵⁾.

e) **Andinopenicilinas o inhibidores de las betalactamasas:** son moléculas que contienen en su estructura un anillo β -lactámico y que pueden unirse a las betalactamasas inactivándolas, de esta forma previenen la destrucción de los antibióticos β -lactámicos, que son el sustrato sobre el que actúan estas enzimas ⁽³⁵⁾. Los inhibidores son conocidos como inhibidores suicidas, debido a que una vez que se unen a la enzima la destruyen, pero también son destruidos por ésta. Hay tres en uso clínico: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam ⁽³⁹⁾.

Tabla 2. Estructura química de los antibióticos β -lactámicos.

Imagen	Anillo secundario	Núcleo del β -lactámico	Antibiótico
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	Penicilinas
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7 α -cefalosporínico	Cefalosporinas
	Ninguno	Monobactamo	Monobactámicos
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	Carbapenémicos
		Ácido clavulánico	Inhibidores de las betalactamasas
		Sulbactam	

1.4.2 Características farmacodinámicas

Los β -lactámicos son antibióticos de actividad bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática alcanzada, siempre que ésta exceda la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente causal, o sea, la concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano ⁽³⁸⁾.

Para la mayoría de los microorganismos sensibles, el β -lactámico se comporta como bactericida porque la concentración bactericida mínima (CBM), o la concentración mínima de antimicrobiano que elimina el 99.9% de los microorganismos viables, es igual o ligeramente superior a la CIM. En las denominadas cepas tolerantes (definidas como aquellas con CBM igual o mayor a 32 veces la CIM) el β -lactámico se comporta como bacteriostático. Por otro lado, la selección de mutantes resistentes durante el tratamiento antibiótico es mucho mayor cuando la concentración del antibiótico es superior a la CIM, pero inferior a la CBM. La actividad bactericida de los β -lactámicos disminuye cuanto mayor es el tamaño del inóculo bacteriano ⁽³⁸⁾.

1.4.3 Mecanismo de acción

Los β -lactámicos ejercen su acción mientras el microorganismo esté en fase de crecimiento produciendo su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana ⁽³⁸⁾.

La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano. La pared bacteriana es una estructura que envuelve las bacterias de todos los géneros, excepto las micoplasmas; se sitúa por fuera de la membrana citoplásmica. Las bacterias Gram negativas tienen una pared fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas, y de una capa interna delgada de peptidoglicano. El esqueleto del peptidoglicano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí para formar una malla, directamente (Gram negativos) o mediante un pentapéptido (Gram positivos). La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos. Los β -lactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación. A nivel de citoplasma existen unas proteínas con actividad enzimática

(transpeptidasas y carboxipeptidasas), que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros β -lactámicos, por lo que se llaman PBP. La función de las PBP es alargar, dar forma y dividir la bacteria (Fig. 3).

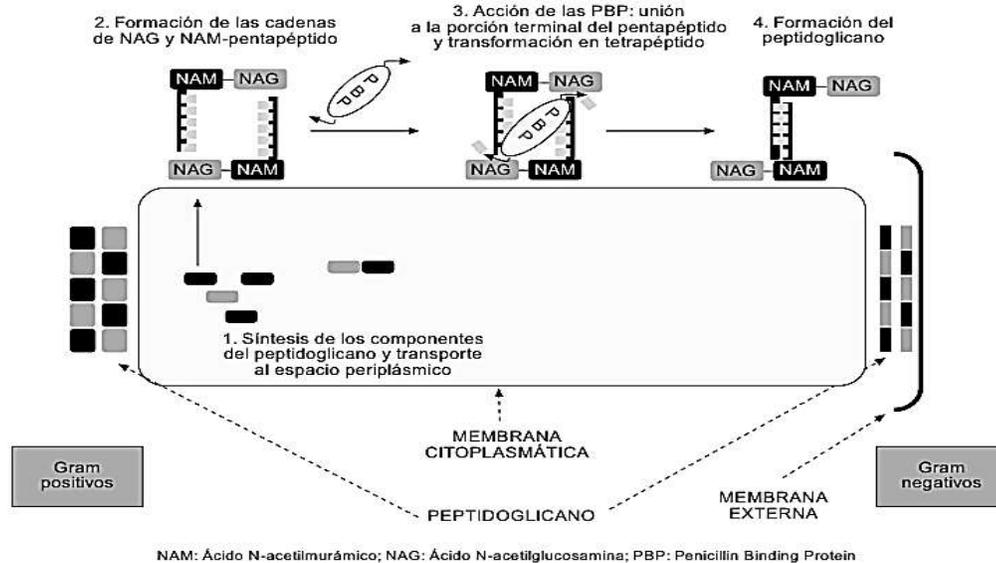
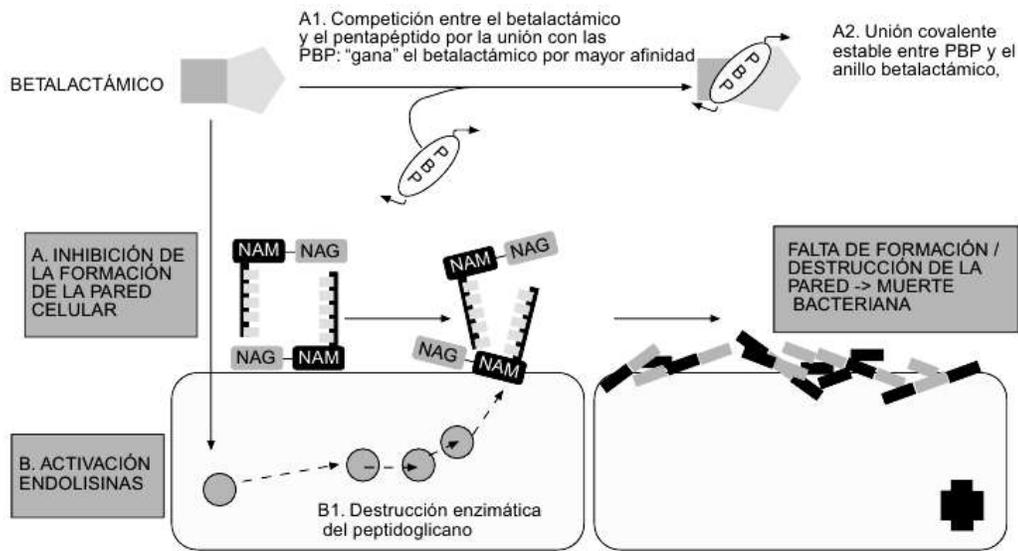


Fig. 3. Etapas de formación de la pared celular bacteriana ⁽³⁸⁾.

Los anillos de los β -lactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los β -lactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular. Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión oncótica⁽³⁷⁾.

Los β -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. Las cepas que carecen de autolisina inhiben su crecimiento en presencia del β -lactámico, pero no se destruyen completamente, por lo que se dice que son tolerantes (Fig. 4)⁽³⁸⁾.



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

Fig. 4. Mecanismo de acción de los β -lactámicos ⁽³⁸⁾.

1.4.4 Espectro de acción

En general, el espectro de los β -lactámicos incluye bacterias Gram positivas, Gram negativas y espiroquetas. No son antimicrobianos activos sobre las micoplasmas (porque éstos carecen de pared celular) ni sobre bacterias intracelulares como las clamidias o las rickettsias, ya que tienen escasa capacidad de penetración a las células. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de betalactamasas ⁽³⁸⁾.

El espectro antimicrobiano de la penicilina G abarca cocos Gram positivos y Gram negativos y bacilos Gram positivos, tanto facultativos como anaerobios, así como espiroquetas y algunos bacilos Gram negativos anaerobios ⁽³⁷⁾. Dentro del grupo de las penicilinas, las aminopenicilinas son específicas a *H. influenzae*; sin embargo, las Enterobacterias (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*, etcétera) son muy sensibles ⁽³⁸⁾.

Las cefalosporinas de primera generación son muy activas sobre los cocos Gram positivos; en líneas generales, las sucesivas generaciones han perdido parte de esta actividad, en beneficio de una actividad mayor frente a bacilos Gram negativos, con excepciones notables ⁽³⁷⁾.

Los carbapenémicos son los β -lactámicos de más amplio espectro, incluidos los microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). El aztreonam (el único monobactámico disponible para uso clínico) posee una actividad excelente sobre

bacterias Gram negativas aerobias y facultativas. Carece de actividad frente a Gram positivos y bacterias anaerobias. Mientras que los inhibidores de betalactamasas en sí mismos no tienen casi ninguna acción antibiótica ⁽³⁹⁾.

1.4.5 Resistencia a β -lactámicos

La resistencia a β -lactámicos puede ocurrir por impermeabilidad, alteración de las PBP, eflujo y producción de betalactamasas.

- a) Los trastornos de permeabilidad corresponden fundamentalmente con la disminución de la expresión de porinas, que son el canal a través de cual la mayoría de los β -lactámicos (hidrófilos) atraviesan la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Es posible que las porinas, debido a mutaciones cromosómicas, no se sintetizan o bien produzcan porinas alteradas, en cuyo caso el fármaco β -lactámico no podrá atravesar la membrana externa o lo hará en concentraciones disminuidas, inadecuadas para bloquear las PBP. En las enterobacterias, las mutantes porínicas suelen sumarse al mecanismo de producción de betalactamasas ^(15, 32).
Modificación del sitio blanco de acción: el sitio blanco de los β -lactámicos son las diferentes PBP. La información genética de estas proteínas se encuentra codificada en el genoma bacteriano y no en plásmidos. Pueden distinguirse distintas alternativas para que se produzca una PBP que presente menor afinidad por los antibióticos. La expresión de un gen alternativo, que codifique una PBP básicamente distinta a la existente. Formación de genes mosaico, por incorporación de fragmentos de material genético de otro microorganismo: este proceso generado por transformación y recombinación homóloga genera genes en parches, cuya secuencia queda constituida en parte por la información preexistente, y en parte por la recientemente adquirida ⁽¹⁵⁾.
- b) El mecanismo de eflujo consiste en bombas de expulsión de antibacterianos que son parecidas a las porinas, pero funcionan en sentido inverso (en lugar de permitir la entrada, expulsan el fármaco antibacteriano) y están encadenadas desde la membrana citoplasmática al espacio periplásmico y de allí a la membrana externa. Mediante estas bombas de eflujo las bacterias eliminan desechos, en conjunto con algunos antibacterianos ⁽³²⁾.
- c) Hidrólisis enzimática: este mecanismo implica la inactivación de los β -lactámicos como consecuencia de la acción de enzimas que reciben el nombre de betalactamasas, y es el

principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos. Estas enzimas son un claro ejemplo de la plasticidad de la genética bacteriana. Probablemente originadas de un reducido grupo de enzimas cromosómicas, constituyen hoy una familia de proteínas de gran disimilitud, que ha requerido numerosas clasificaciones con el intento de poderlas agrupar ⁽¹⁵⁾. Estas enzimas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, con lo que el antibacteriano no puede unirse a las PBP, y no se produce el impedimento de la síntesis de la pared celular. Pueden inactivar un antibiótico β -lactámico en particular o distintas combinaciones de ellos, pueden ser cromosómicas o plasmídicas y sintetizarse de forma permanente o solo en presencia de un agente inductor ⁽³²⁾.

1.5 Clasificación de las betalactamasas

Las betalactamasas generalmente son clasificadas de acuerdo con dos esquemas, el de Ambler y el de Bush-Jacoby-Madeiras ⁽⁴¹⁾.

La clasificación de Ambler posee cuatro clases A, B, C, D, y está basada en la homología de los aminoácidos y no considera las características fenotípicas ⁽⁴²⁾.

Las enzimas de clase A, cuyo prototipo es la enzima TEM-1, (actualmente presente en más del 50% de los aislamientos de enterobacterias en general), están codificadas en plásmidos. En esta clasificación la clase B son metalobetalactamasas (requieren zinc para su actividad), están codificadas en plásmidos, están incluidas las enzimas que confieren resistencia a los carbapenémicos. Las enzimas pertenecientes a la clase C están generalmente codificadas en el cromosoma bacteriano y son típicamente inducibles por β -lactámicos. Finalmente, las enzimas de clase D constituyen un grupo reducido de enzimas plasmídicas, con actividad incrementada sobre oxacilina (OXA-1) ⁽¹⁵⁾.

La clasificación de Bush-Jacoby-Madeiras se basa en la similitud funcional, en el peso molecular de la enzima, su punto isoelectrico (pI), el perfil de sustrato y la propiedad de ser inhibidas por la presencia de ácido clavulánico o EDTA. En base a este esquema surgen cuatro grupos funcionales que se correlacionan bien con la clasificación de Ambler, denominándose: 1, 2, 3 y 4 ⁽⁴³⁾.

Las enzimas del grupo 1, clase C de Ambler, corresponden a enzimas con acción cefalosporinasa, no inhibibles ni por ácido clavulánico ni por EDTA, y que se correlacionan con las enzimas cromosómicas de bacilos Gram negativos de tipo *AmpC*. Aquellas enzimas

que pertenecen al grupo 2 son penicilinasas y cefalosporinasas inhibibles por ácido clavulánico, y coinciden mayoritariamente con el tipo A de Ambler. Las del grupo 3 son inhibibles por EDTA, pero no por ácido clavulánico, se corresponden con las metaloenzimas de tipo B. Las del grupo 4, no descrito por Ambler, incluye penicilinasas no inhibibles por ácido clavulánico ⁽¹⁵⁾.

Las betalactamasas plasmídicas son fundamentalmente las de clase A, que clásicamente se encuentran en plásmidos, y ofrecen al menos dos motivos de alerta: su fácil diseminación inter e intraespecie, y su alta variabilidad con el consiguiente aumento del espectro de acción; mientras que las cromosómicas, de clase C, no son inhibibles. Son cefalosporinasas, pero no son altamente eficientes. Confieren resistencia a cefalosporinas de segunda generación, y dependiendo de su cantidad, también son capaces de conferir resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, debe señalarse que desde hace unos años no es poco frecuente la detección de betalactamasas de clase C en plásmidos ⁽¹⁵⁾.

Dos tipos de betalactamasas han sido objeto de mayor de estudio en los últimos años, por un lado las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que han emergido como el principal problema en pacientes hospitalizados, así como en pacientes en la comunidad y las carbapenemasas ⁽⁴⁴⁾.

1.6 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las primeras betalactamasas reconocidas fueron las penicilinasas. Luego de la introducción de la ampicilina en los inicios de 1960, se describió una betalactamasa que la hidrolizaba, se denominó betalactamasa TEM-1. Posteriormente, se descubrió una enzima relacionada, la TEM-2. Ambas enzimas son de codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación, lo que explicó su rápida dispersión. En aislados de *Klebsiella pneumoniae* se encontró otro tipo de betalactamasa denominado SHV-1, de inicio fue cromosómica, hoy en día es codificada en plásmidos transferibles ⁽³²⁾.

Dado que estas betalactamasas ampliaban el espectro de hidrólisis de la penicilinasas, se las denominó betalactamasas de espectro ampliado (BLEA). Las cuales son casi siempre de codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación. Más adelante, surgió una serie de nuevas betalactamasas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta

generación y los monobactámicos, fueron denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ⁽³²⁾.

Hoy en día se conocen más de 140 BLEE diferentes de la familia TEM, que prevalecen en los Estados Unidos y Europa. Hay más de 50 BLEE de tipo SHV de distribución universal, y un nuevo grupo que prevaleció en Sudamérica y Europa del Este, las CTX-M, cuya designación se refiere a su efecto particular sobre la cefotaxima y la ceftriaxona. Ya se conocen cerca de 40 ⁽³²⁾.

En América Latina, la recuperación de aislados productores de BLEE empezó a aumentar en la década 1990 y coincidió con el uso extendido de ceftriaxona. Debe prestarse atención a la aparición en América Latina de aislados de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli* productores de BLEE ⁽³²⁾.

1.7 Carbapenemasas

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de las betalactamasas, con un amplio espectro de acción inigualable por otras enzimas betalactamasas. Aunque son conocidas como “carbapenemasas”, muchas de estas enzimas tienen actividad sobre todos los β -lactámicos y muchas son resistentes a los inhibidores de betalactamasas comerciales ⁽⁴⁵⁾.

Las carbapenemasas pertenecen a dos familias moleculares principales, que se distinguen por el mecanismo hidrolítico en el sitio activo. Las primeras carbapenemasas fueron descritas en bacilos Gram positivos. A diferencia de otras betalactamasas conocidas, éstas fueron inhibidas por EDTA, por lo que les llamaron metaloenzimas. En trabajos posteriores se demostró que todas las carbapenemasas metaloides contienen al menos un átomo de zinc en su sitio activo lo que les facilita la hidrólisis del anillo β -lactámico. A mediados y finales de la década de los 1980, otro conjunto de enzimas hidrolizantes de carbapenemas se encontró entre la familia *Enterobacteriaceae*, pero éstas no eran inhibidas por EDTA. Se demostró que estas enzimas utilizaban serina en sus sitios activos y eran inactivadas por inhibidores de betalactamasas comerciales ⁽⁴⁵⁾.

En el esquema de clasificación funcional, las carbapenemasas se encuentran principalmente en los grupos 2f y 3, mientras que en el esquema de Ambler las clases moleculares A, C y D incluyen las betalactamasas con serina en su sitio activo y las de clase B son todas las metaloenzimas con zinc en su sitio activo ⁽⁴⁵⁾.

Las carbapenemasas pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles.

1.7.1 Serín-carbapenemasas

Las serín-carbapenemasas hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Su actividad hidrolítica depende del sustrato sobre el que actúan. Suelen dividirse fenotípicamente en seis diferentes grupos, cuatro grupos están formados por miembros de las enzimas SME, IMI, KPC y GES, que se caracterizan por tener en común tres motivos altamente conservados esenciales para su actividad, mientras que SHV-38 y SFC-1 constituyen cada una un grupo diferente.

Estas enzimas usualmente se encuentran presentes en bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae⁽⁴⁰⁾.

Las carbapenemasas llamadas oxaciclinasas se ubican dentro del grupo 2df de Bush (clase D) descritas en 1980. Se caracterizan por su capacidad de hidrolizar cloxacilina y oxacilina, carbapenémicos⁽⁴⁰⁾.

1.7.2 Metalobetalactamasas (MBLs)

Este es quizá el grupo más relevante de carbapenemasas debido tanto a su diversificación estructural como a su diseminación prácticamente mundial y en diferentes especies bacterianas. Son enzimas que típicamente hidrolizan todos los β -lactámicos excepto monobactámicos, pertenecen al grupo B de Ambler, y 3a y 3b en la clasificación de Bush. Dentro de las MBLs se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM. Las más importantes incluyen las familias IMP, GIM, SIM y SPM⁽⁴⁰⁾.

1.8 Genes de resistencia

En general, los genes de resistencia codifican proteínas que inactivan el antibiótico o bien protegen la célula por algún otro mecanismo⁽²⁾. Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética, principalmente las Gram negativas. Nuevos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos por mutación o adquisición de plásmidos o transposones, los cuales son elementos de expresión genética que sin promotor incorporan

genes, de tal modo que se convierten en genes funcionales en células bacterianas de especies relacionadas o diferentes ^(15, 46).

1.8.1 Genes de resistencia a β -lactámicos

Los genes que codifican para las BLEE pueden ser fácilmente transferidos horizontalmente inter e intra-especies, presentándose la transferencia más frecuente de los genes TEM, SHV y CTX-M. Las BLEE se originaron y derivan en su mayoría de las betalactamasas clásicas TEM y SHV las cuales surgen a partir de una serie de mutaciones puntuales que alteran su centro activo, como respuesta a la presión selectiva ejercida por el amplio uso de las cefalosporinas de tercera generación. Los genes de las BLEE son transmitidos por plásmidos y a menudo se encuentran en los transposones e integrones, facilitando su movilización con otro mecanismo de resistencia. Los plásmidos que determinan las BLEE contienen, con frecuencia, otros genes de resistencia para distintos antimicrobianos, como aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol ⁽⁴⁶⁾.

Gen *bla_{TEM}*. La enzima TEM-1 es la betalactamasa que se ha descrito con mayor frecuencia en Gram negativos y está codificada por el gen *bla_{TEM-1}*. La enzima TEM fue identificada por primera vez en *Escherichia coli* en Grecia. Este gen es uno de los más dominantes, el número de mutantes alcanza hasta TEM-167 ⁽⁴⁶⁾.

Gen *bla_{SHV}*. La enzima codificada por este gen se descubrió en 1983 en Alemania, y es capaz de hidrolizar las cefalosporinas de más amplio espectro (SHV-2). Se han descrito variantes que llegan hasta SHV-114 ⁽⁴⁶⁾.

Gen *bla_{CTX-M}*. La betalactamasa codificada por el gen *bla_{CTX-M-15}* fue reportada por primera vez en India en 1990, y en Colombia en 2004. Se conocen más de 80 tipos de CTX-M. Además, en cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli* se han encontrado los tipos CTX-M-2, CTX-M-3, y CTX-M-14 ⁽⁴⁶⁾.

Genes de Serín-carbapenemasas

Los genes que codifican para las enzimas SME, IMI, NCM, SHV-8 y SFC-1 se localizan principalmente en el cromosoma, pero existen reportes de aislamientos que poseen enzimas SME, IMI y NCM presentes en plásmidos ⁽⁴⁰⁾.

Genes de metalobetalactamasas

Se desconocen los orígenes de los genes adquiridos de metalobetalactamasas. Las fuentes más probables son bacterias ambientales, de las cuales los Gram negativos no fermentadores y las *Enterobacteriaceae* podrían adquirir los determinantes de la resistencia debido a que comparten varios nichos ambientales comunes. La naturaleza diferente de los elementos genéticos móviles que están asociados con los genes adquiridos de metalobetalactamasas podría explicar en parte sus diferentes propensiones a la diseminación (45, 47).

Los genes de MBLs en su mayoría están localizados en elementos genéticos tales como los integrones o insertados en elementos móviles como transposones y plásmidos, se han extendido rápidamente entre los agentes patógenos de importancia clínica. Se distinguen nueve grupos: *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{AIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{DIM}* y *bla_{KPC}* (46). La adquisición de estos genes potencialmente pueden conferir resistencia a un amplio espectro de antibióticos β-lactámicos y en algunas ocasiones pueden estar asociados con genes que confieren resistencia a aminoglucósidos (40).

Gen *bla_{GIM}*. Como ya se ha mencionado la producción de betalactamasas es un obstáculo importante en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas. A la fecha, se han descrito mayormente IMP, VIM y NDM-1 por ser los más distribuidos geográficamente, mientras otros, como GIM-1 no se han establecido globalmente. GIM-1 fue descubierta en cinco aislados de *Pseudomonas aeruginosa* del área de terapia intensiva del University Hospital of Düsseldorf (Alemania) en 2002, en el cual el gen *bla_{GIM-1}* fue localizado en un plásmido intransferible de 22 kb incrustado en el integrón clase 1 In77; GIM tenía aproximadamente un 30% de homología con VIM, un 43% de homología con los IMP y un 29% de homología con SPM (45). Desde entonces, GIM-1 ha sido descrito en solo unos pocos aislados de *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter pittii* y *Pseudomonas aeruginosa*, casi exclusivamente en la región de Düsseldorf y nunca fuera de Alemania (47, 48).

Gen *bla_{SIM}*. El tipo SIM-1, que significa imipinemasa de Seúl, fue descrita por primera vez de un aislado de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos en un Hospital Universitario de Corea en 2003, y ha sido confinado solo a aislados de *Acinetobacter spp.* en Corea del Sur. Sin embargo, recientemente se aisló en un paciente chino una cepa de

Acinetobacter baylyi con un plásmido de 360 kb que lleva dos genes *bla_{SIM-1}* y *bla_{OXA-23}*, este paciente no tenía un historial de haber visitado Corea del Sur, por lo que se desconoce la fuente de este gen⁽⁵⁰⁾. SIM-1 es un miembro raramente detectado de las MBL, y presenta más del 64% de identidad en la secuencia de aminoácidos con IMP, lo que las hace muy cercanas⁽⁵¹⁾.

Gen *bla_{SPM}*. Brasil fue la sede de los dos eventos deportivos más importantes a nivel mundial: La copa del mundo de la FIFA en 2014 y los Juegos Olímpicos de Río de Janeiro en 2016. Estos eventos propiciaron la oportunidad para la propagación global de la metalobetalactamasa de São Paulo (SPM) desde Brasil. SPM-1 es una betalactamasa de importancia clínica y epidemiológica en Brasil. Esta enzima es una metalcarbapenemasa adquirida que confiere resistencia a todos los β -lactámicos, excepto monobactámicos. El gen *bla_{SPM-1}* está asociado con la secuencia de inserción ISCR4, el cual es un miembro de la familia ISCR y puede movilizar segmentos de ADN. SPM-1 fue reportado por primera vez en 2002 en un aislado *P. aeruginosa* en Brasil, pero las bacterias productoras de SPM de esta especie se han diseminado en muchas regiones de Brasil; el gen no ha sido propagado (aún) a otras especies o géneros bacterianos. A más de 11 años de su descripción inicial, a la fecha solo se ha reportado un caso fuera de Brasil, en un paciente suizo quien tuvo atención médica en el noreste de Brasil. No hay una explicación obvia para la restricción geográfica de SPM-1, que contrasta marcadamente con la dispersión observada para otras metalcarbapenemasas adquiridas como las pertenecientes a las familias IMP, VIM y NDM⁽⁵²⁾. Esta baja propensión a la propagación podría estar relacionada con los diferentes elementos genéticos móviles⁽⁴⁷⁾.

1.9 Situación global de la resistencia a β -lactámicos

La resistencia a β -lactámicos en *Salmonella enterica* se debe principalmente a la adquisición de enzimas betalactamasas adquiridas horizontalmente⁽⁵³⁾. Las betalactamasas han sido detectadas globalmente incluyendo *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{SHV}* y *bla_{OXA}* y variantes de éstos, siendo TEM-1, PSE-1 y OXA-1 las más frecuentemente destacadas y relacionadas con la resistencia a ampicilina^(21, 54).

Es interesante que, a través del mundo, la resistencia a cefalosporinas en *Salmonella* es muchas veces codificado por BLEE's, los cuales tienen mutaciones de diferentes linajes de

betalactamasas ^(55, 56). Las BLEE's pueden encontrarse en aislados de *Salmonella* tanto de animales como humanos en Europa, Asia y el Sur de América ^(55, 57-61).

A diferencia de otras enterobacterias, el género *Salmonella* carece de betalactamasas cromosómicas constitutivas. Ello podría explicarse por el costo biológico que supone su mantenimiento, pues se considera que la expresión a alto nivel de este tipo de enzimas resultaría incompatible con la capacidad invasiva y de multiplicación intracelular de *Salmonella*. Así pues, lo más habitual es que, si *Salmonella* llega a producir betalactamasas, éstas sean de origen plasmídico, y de ellas, las más frecuentes son de tipo TEM, SHV, OXA y CTX-M. Las BLEE detectadas en *S. enterica* más frecuentes en Europa proceden tanto de pacientes humanos –enfermos y portadores asintomáticos– como de animales de granja y de compañía. Se ha demostrado la difusión clonal de cepas de origen humano y animal del serotipo Virchow portadoras de *bla*_{CTX-M-9} aisladas en España. A destacar, los distintos brotes de *Salmonella* Virchow portadora de *bla*_{CTX-M-2} o *bla*_{CTX-M-9}, así como hallazgos de diversos serotipos portadores de *bla*_{TEM-14} o *bla*_{TEM-52} y de *bla*_{SHV-12}. Se ha descrito la incorporación de una BLEE, una CTX-M-15, en el cromosoma bacteriano a partir de plásmidos conjugativos, concretamente en aislados de *Salmonella* serotipo Concord, procedentes de Etiopía. En un estudio reciente de caracterización de BLEE en *S. enterica* se hallaron las enzimas CTX-M-15, CTX-M-10 y SHV-12 ⁽⁶²⁾.

En el caso de las carbapenemasas, es importante mencionar que, a diferencia de las metalobetalactamasas cromosómicas, cuya presencia correlaciona directamente con la prevalencia de las especies productoras, ha habido un aumento espectacular en la detección y propagación de las familias adquiridas o transferibles de estas metaloenzimas. Las familias de metalobetalactamasas más comunes incluyen las enzimas VIM, IMP, GIM y SIM, que están ubicadas dentro de integrones, donde se han incorporado como casetes de genes. Cuando estos integrones se asocian con plásmidos o transposones, la transferencia entre bacterias se facilita. La identificación de la metalobetalactamasa SPM-1 definió una nueva familia con 35.5% de identidad de aminoácidos con IMP-1 ⁽⁴⁵⁾. En la Fig. 5 se muestra la diseminación mundial de los diferentes tipos de metalobetalactamasas.

1.9.1 Estudios realizados en *Salmonella enterica*

A continuación, se resumen algunos de los estudios que se han realizado en *Salmonella enterica* en los últimos años en diferentes partes del mundo, sobre todo aquellos realizados en aislados de animales para consumo y alimentos.

En Francia se analizaron 538 cepas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium aislados por la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria procedentes de diversas fuentes de alimentos y animales aislados entre 1999 y 2009. El 12% se encontraron portadoras del gen *bla_{TEM}*⁽⁶³⁾.

En los Estados Unidos un estudio en aislados de *Salmonella* procedentes de animales mostró que los genes que codifican betalactamasas con mayor prevalencia son *bla_{TEM-1}*, *bla_{PSE-1}* y *bla_{CMY-2}*⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾. Mientras que otro estudio en 326 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de animales comestibles y carnes de venta encontró a *bla_{CMY}* en un 63.3% y *bla_{TEM}* solo en 9 aislados de carnes y en 17 de animales⁽⁶⁸⁾.

Dos estudios en Portugal, uno de ellos en aislados de *Salmonella spp.* recuperados de aves de corral, cerdos y productos alimenticios de origen animal durante el periodo de 2009-2011 mostró dos aislados portadores del gen *bla_{CTX-M-1}*; *bla_{CTX-M-14}*, *bla_{CTX-M-15}* y *bla_{CTX-M-32}* en un aislado cada uno (toda esta familia reportados por primera vez en este tipo de aislados en Portugal); *bla_{SHV-12}* y *bla_{TEM-1}* en dos aislados⁽⁶⁹⁾. Otro estudio en 258 cepas de *Salmonella enterica* provenientes de aves de corral, cerdos, ganado y alimentos procesados durante 2011-2012. El 36% del total de las cepas fueron resistentes a ampicilina, *Salmonella* Typhimurium fue el serotipo más resistente. Este fue el primer informe de un *bla_{CTX-M-1}* en *Salmonella* Typhimurium en Portugal⁽⁷⁰⁾.

En España se estudió la sensibilidad a antibióticos en 114 cepas de *Salmonella enterica* procedentes de pacientes durante el período 2009-2010 encontrándose un 55% de resistencia a ampicilina donde el serotipo más resistente fue Typhimurium. En aislados ampicilina resistente (AMPR) se observaron 17 fenotipos distintos de multiresistencia. El gen más frecuente fue *bla_{TEM-1}* (64%), seguido de *bla_{PSE-1}* (21%) y *bla_{OXA-1}* (13%). El gen *bla_{PSE-1}* fue detectado frecuentemente en los aislados AMPR⁽²¹⁾. Por otro lado, un estudio centrado en 84 aislados de *Salmonella* Rissen obtenidos de carne de cerdo y res, alimentos y muestras clínicas asociadas con casos de gastroenteritis detectó resistencia a ampicilina y su relación con el gen *bla_{TEM-1}*. La mayoría de los genes identificados fueron transportados por integrones⁽⁷¹⁾.

En China se examinaron 310 cepas de *Salmonella enterica* provenientes de granjas de pollos de engorde donde se detectaron 133 cepas de *Salmonella* serotipo Indiana y 177 de *Salmonella* serotipo Enteritidis. Se presentó resistencia, entre otros, a ampicilina. El 82.2% de las cepas de *Salmonella* Indiana poseían el gen de resistencia *bla*_{TEM}⁽⁷²⁾. Otro estudio se realizó en 138 cepas de *Salmonella* resistentes a ceftriaxona recuperadas de alimentos. El 21.7% de las cepas se identificaron positivos para BLEES y los serotipos Indiana y Shubra se identificaron por primera vez como productores de BLEES. El gen *bla*_{TEM-1B} se detectó en 26 cepas⁽⁷³⁾. En otra investigación en 60 de 699 aislados de *Salmonella* recuperada de pollos crudos fueron productores de BLEES. De estos, 44 aislados resistentes a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ceftiofur, ceftriaxona y cefoxitina. El gen más detectado fue *bla*_{TEM}, seguido de *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{PSE-1}, *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-15}. Se informó por primera vez una cepa de *Salmonella* portadora de *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CMY-2} y *bla*_{CTX-M-3} simultáneamente. Los resultados demostraron que las betalactamasas y BLEE estaban surgiendo y prevaleciendo en *Salmonella* transmitida por los alimentos⁽⁷⁴⁾. También en China se realizó una investigación en 110 cepas de *Salmonella* no tifoidea obtenidas de productos alimenticios importados de 2011 a 2013. Nueve cepas fueron resistentes a la ampicilina y/o una o más cefalosporinas; las nueve cepas portaban el gen *bla*_{TEM-1}, con o sin los genes *bla*_{CTX-M-9} o *bla*_{OXA-1}⁽⁷⁵⁾.

Finalmente, en Corea del Sur se realizó una investigación en cepas de *Salmonella spp* provenientes de carne de pollo, 5 cepas fueron identificadas del serotipo Bellevue y 6 Enteritidis. Las cepas de *Salmonella* Bellevue fueron resistentes a cinco antibióticos, entre ellos ampicilina. Las cepas de *Salmonella* Enteritidis presentaron resistencia a nueve antibióticos, entre los cuales estaba ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, cefazolina y cefalotina. Además, todas portaron el gen *bla*_{CTX-M-15}⁽⁷⁶⁾.

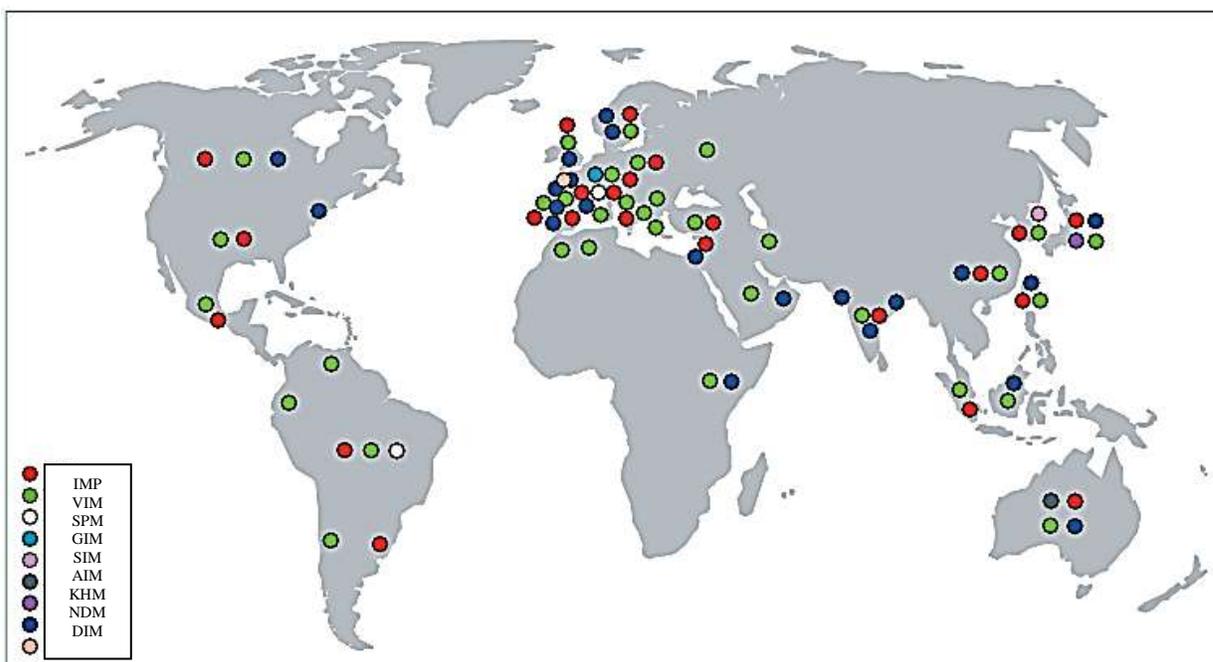


Fig. 5. Distribución mundial de los diferentes tipos de metalobetalactamasas ⁽⁴⁷⁾.

1.10 Antecedentes en México

Los estudios sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos en México se centraron inicialmente en las infecciones gastrointestinales. En 1973 se publicó el primer reporte relacionado con la resistencia a los antibióticos en bacterias causantes de cuadros diarreicos o síndromes de fiebre entérica (fiebre tifoidea) en México; encontrándose resistencia a cloranfenicol, tetraciclina, estreptomina y a las sulfonamidas en el 91.7% de cepas de *Salmonella Typhi* analizadas ⁽⁷⁷⁾.

En 1989 Santos y col., reportaron los resultados *in vitro* de la sensibilidad de *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* y *E. coli* en aislamientos provenientes de pacientes internados en un hospital pediátrico en la ciudad de México a lo largo de tres décadas, 1960, 1970 y 1980. Los resultados mostraron una resistencia en aumento a los antibióticos más comúnmente utilizados como la ampicilina. En el 2007 y el 2009 se reportó el surgimiento y la diseminación de un patógeno entérico multirresistente, *Salmonella Typhimurium*, por la producción de una betalactamasa de tipo *AmpC* ^(78, 79).

Un estudio en cepas de *Salmonella enterica* presentó un amplio abanico de resistencias. Las más frecuentes fueron: tetraciclina, estreptomina, ácido nalidíxico, ticarcilina, ampicilina, y cloranfenicol. Solo el 11.3% de los aislamientos de *Salmonella* fueron sensibles a todos los antibióticos considerados en este estudio, y el 37.1% presentaron

una única resistencia. Y el 51.4% restante fueron resistentes a dos o más antibióticos, el 20% de ellos a 4 o más antibióticos, pudiendo detectarse hasta ocho resistencias simultáneas. No se encontró ninguna relación entre los tipos de resistencias y los serotipos. Los serotipos que presentan un número más elevado de resistencias son Hadar, Typhimurium y Virchow. Tampoco existe relación clara entre tipo de resistencia y tipo de alimentos ⁽³¹⁾.

En un estudio realizado en la Ciudad de México se encontró que entre el 70-95% de cepas estudiadas presentó resistencia a β -lactámicos (ampicilina, carbenicilina) y el 73% de los aislados resultaron multirresistentes ⁽⁸⁰⁾.

En 2001-2002, aislados mexicanos de *Salmonella* mostraron resistencia a tetraciclina (82%), co-trimoxazol (66%) y ampicilina (66%), porcentajes mayores a los presentados en 1994-1995. México, junto con Colombia y Argentina, tienen la más alta prevalencia de resistencia en esta región ⁽⁸¹⁾.

Desde el final de la década de los años noventa se han descrito pruebas para inferir la producción de BLEE en el laboratorio de microbiología clínica, así como la identificación de variantes de las betalactamasas de tipo SHV, que es el tipo de BLEE más comúnmente identificado en México ⁽⁸²⁻⁸⁴⁾.

A partir de 2009, la investigación relacionada con la resistencia bacteriana a los antibióticos mediada por diferentes BLEE se expandió hasta incluir descripciones de los plásmidos y transposones que codifican para SHV-5. Se describió la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en un hospital en Monterrey, donde la CTX-M-15 fue la BLEE más frecuentemente encontrada ^(85, 86).

En el estado de Yucatán y otros tres estados mexicanos se encontró que 61 cepas de *Salmonella* Typhimurium portaban el gen *bla*_{CMY-2} ⁽⁷⁹⁾. Un aislado tuvo el gen *bla*_{TEM-1} ⁽⁸⁷⁾.

La carne de diferentes especies, entre ellas la de bovino, es un vehículo importante de transmisión de *Salmonella*; desafortunadamente, la frecuencia con la que se presentan determinados serotipos de *Salmonella spp.*, suele variar espacial y temporalmente. En México, las investigaciones más recientes sobre carne de res fueron realizadas entre cinco y 13 años atrás. Por tanto, resulta necesario generar información actualizada que contribuya a evaluar el riesgo a la salud pública derivado de la presencia de *Salmonella spp.* en carne de bovino, que es el segundo tipo de carne más consumido en el país ⁽⁸⁰⁾.

Es preocupante el incremento de aislados de *Salmonella enterica* resistentes a algunos de los antibióticos utilizados para el tratamiento empírico, en particular amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y cefalosporinas de tercera generación ⁽²¹⁾.

1.11 Antecedentes en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana en Michoacán

Nuestro grupo de trabajo cuenta con una colección de cepas de diversos serotipos de *Salmonella enterica* provenientes de muestras de carne y productos lácteos del estado de Michoacán, aisladas durante los años 2008-2015 por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán (LESPM) y serotipificadas por Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White. Durante los últimos años se han realizado diversos estudios a esta colección de cepas (Tabla 3).

Tabla 3. Principales estudios realizados en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana con cepas de *S. enterica*.

Referencia	Resultados	Conclusión
Aislamiento y caracterización de cepas de <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> de productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán ⁽⁸⁸⁾ .	Aislados de <i>Salmonella enterica</i> (120), el 53% provenientes de la región centro del estado de Michoacán. El 46% de los aislados se obtuvieron de carnes crudas, 34% de chorizos, 14% de quesos y el resto de otros productos. Los serotipos más abundantes fueron Typhimurium (13%), Anatum (12%), serogrupo B (11%) y Agona (9%) encontrándose en menor proporción otros 30 serotipos. No se mostró agrupamiento de los aislados por tipo de muestra, por localidad de origen o por serotipo.	Alta diversidad fenotípica y genotípica de <i>S. enterica</i> . Incidencia baja para el periodo de estudio.
Resistencia a los antibióticos y presencia de integrones en aislados de <i>Salmonella enterica</i> obtenidos de productos cárnicos y lácteos en el estado de Michoacán ⁽⁸⁹⁾ .	Se presentó resistencia principalmente a carbenicilina, cloranfenicol, ampicilina trimetoprim/sulfametoxazol. El 30% de las cepas fueron multirresistentes, principalmente los serotipos Typhimurium, Anatum, Panamá, B y c1. Del total de 119 cepas, el 65% presentaron varios amplicones (200-4000 pb), distribuyéndose en los serotipos Derby (100%), Vejle (80%), B (70%) y Agona (70%), Anatum (62%), Typhimurium (60%), Give (57%), Panamá (50%), y c1 (40%).	Amplia diseminación de resistencia a varios agentes antimicrobianos Alta prevalencia de integrones clase I. No se sabe que genes se encuentran implicados en la diseminación de dicha resistencia.
Elementos Repetitivos para el	El ensayo BOX mostró tener un mayor	La importancia de

<p>análisis de Diversidad Genética de cepas de <i>Salmonella enterica</i> aisladas de productos cárnicos y lácteos del Estado de Michoacán ⁽⁹⁰⁾.</p>	<p>poder de discriminación, permitió ordenar a las cepas en 20 genotipos a un corte de 95% de similitud, con un índice de discriminación (D) de 0.964. No hubo relación entre el genotipo y el serotipo. Gran capacidad de dispersión para Typhimurium y Anatum. No existe relación entre la distancia geográfica y la distancia genética de los aislados analizados.</p>	<p>evaluar las relaciones genéticas en cepas de <i>S. enterica</i> en el estado de Michoacán con la finalidad de optimizar los programas de vigilancia y prevención epidemiológica.</p>
<p>Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de <i>Salmonella enterica</i> obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán ⁽⁹¹⁾.</p>	<p>Se encontraron 20 Secuencias Tipo (ST) diferentes y 2 ST no determinadas con una amplia distribución geográfica mundial, así como su persistencia en una amplia variedad de hospederos y contaminando varios alimentos y muestras de medio ambiente.</p>	<p>Se encontraron dos ST previamente reportadas en México. Se sugiere que la ST19 puede ser la fundadora original de la población estudiada para Michoacán.</p>
<p>Perfiles de virulencia de aislados de <i>Salmonella enterica</i> obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán ⁽⁹²⁾.</p>	<p>Se encontraron 8 perfiles de virulencia (PV). No se encontró relación entre el PV y la Secuencia Tipo (ST) de las cepas. Se encontró relación entre el PV y el serotipo. El PV1 (<i>invA</i>, <i>sopE</i>, <i>ssaQ</i>, <i>rmbA</i>, <i>spi4-F</i> y <i>sopB</i>) fue el de mayor distribución geográfica en el estado.</p>	<p>Las cepas de <i>S. enterica</i> obtenidas de alimentos en el estado de Michoacán presentan genes de virulencia que las hacen de interés en salud pública.</p>
<p>Elementos genéticos asociados a la resistencia a antibióticos en cepas de <i>Salmonella enterica</i> aisladas de alimentos del estado de Michoacán ⁽⁹³⁾.</p>	<p>De las 120 cepas analizadas, el 65% no presentaron ninguna de las variantes de los genes de resistencia <i>tet</i> (resistencia a tetraciclinas) y <i>sul</i> (resistencia a sulfonamidas). En el 35% de los aislados se encontró por lo menos uno de dichos genes. Las cepas que portaron los genes <i>tet</i>, se encontraron de manera única. En el caso de los genes <i>sul</i> se encontraron todas las combinaciones posibles. Dos aislados presentaron integrón clase 2 (Typhimurium y Serogrupo B). Se encontraron distintas combinaciones de genes <i>tet</i> y <i>sul</i> con integrones. En dos de las cepas se encontró la presencia simultánea de integrones clase 1 y clase 2. La presencia de genes de resistencia mostró una distribución geográfica amplia en Michoacán.</p>	<p>Gran variación de combinaciones de genes de resistencia a antibióticos. La incidencia de los distintos determinantes genéticos de resistencia encontrados difiere de los reportados para otras cepas de <i>S. enterica</i> obtenidas de alimentos en distintas partes del mundo. En general, se presenta una relación entre la presencia de genes de resistencia y el fenotipo de resistencia/sensibilidad de las cepas de estudio, aunque existen excepciones a dicha relación.</p>

2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones causadas por ingestión de alimentos contaminados por *Salmonella enterica* son un problema de salud pública mundial, que se agrava con la creciente selección de cepas resistentes a los antibióticos, particularmente a β -lactámicos. Dicha resistencia está estrechamente relacionada con distintos determinantes genéticos, tales como los genes de resistencia o elementos de transferencia horizontal cuya incidencia difiere en distintas partes del mundo por lo que se afirma que hay un dinamismo espacio-temporal. Sin embargo, pocos estudios analizan los determinantes genéticos asociados a la resistencia a antibióticos, por lo que es de notable importancia estudiar la incidencia de dichos determinantes genéticos para las cepas de *S. enterica* que han estado circulando en Michoacán, en un periodo largo y que puede ayudar a determinar cadenas de transmisión.

3. HIPÓTESIS

Existe una relación positiva entre la presencia de los determinantes genéticos *bla*_{TEM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM} y el patrón de resistencia a β -lactámicos de las cepas de *Salmonella enterica* del estado de Michoacán aisladas de muestras de alimentos durante los años 2008-2015.

4. OBJETIVOS

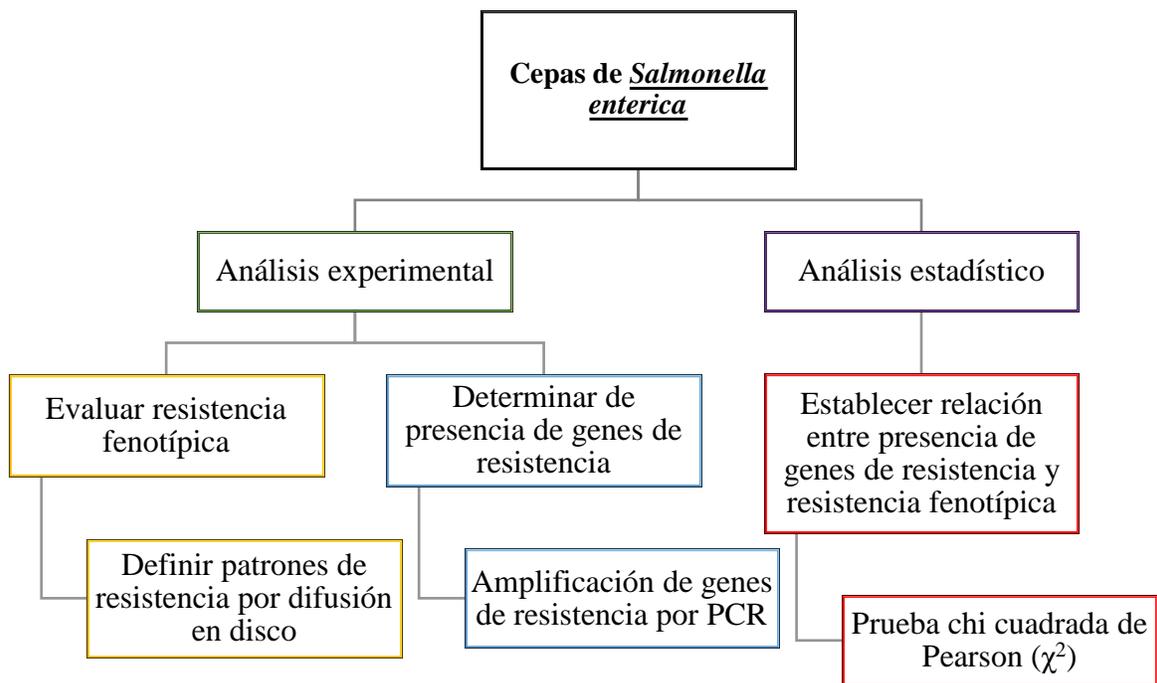
4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de determinantes genéticos *bla_{TEM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{GIM}* y *bla_{SPM}* en las cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos del estado de Michoacán, durante el periodo 2008-2015 y determinar si existe o no una relación estadísticamente significativa entre la presencia de los distintos determinantes genéticos y la resistencia fenotípica reportada en las cepas de estudio.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{GIM}* y *bla_{SPM}* de resistencia a β -lactámicos en las cepas de estudio.
- Relacionar las combinaciones de genes con las resistencias reportadas para las cepas analizadas.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se estudiaron 261 cepas de diversos serotipos de *Salmonella enterica* provenientes de muestras de carne (n=232), productos lácteos (n=26) y otros de origen desconocido (n=3) del estado de Michoacán, aisladas durante los años 2008-2015 por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán (LESPM), y serotificadas por Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White ⁽⁸⁸⁾ (Tabla 4). Las cepas se encontraban preservadas en agar francés al inicio del presente estudio. De todas las cepas analizadas, solo de 212 se disponía del patrón de resistencia a antibióticos, en donde se ve con claridad el predominio de la multirresistencia (Tabla 5) ⁽⁹¹⁾.

Tabla 4. Serotipo de las cepas de <i>S. enterica</i> analizadas.			
Serotipo	N^o. de cepas (%) N=261	Serotipo	N^o. de cepas (%) N=261
Anatum	27 (10%)	Weltevreden	3 (1%)
Typhimurium	20 (8%)	Javiana	3 (1%)
Agona	18 (7%)	Braenderup	2 (0.7%)
Serogrupo B	15 (6%)	Hadar	2 (0.7%)
Derby	13 (5%)	Kentucky	2 (0.7%)
Panama	13 (5%)	Meleagridis	2 (0.7%)
Enteritidis	11 (4.3%)	Reading	2 (0.7%)
Senftenberg	10 (4%)	Schwarzengrund	2 (0.7%)
Serogrupo C1	7 (3%)	Serogrupo B Monofásica	2 (0.7%)
Montevideo	7 (3%)	Serogrupo D Monofásica	2 (0.7%)
Infantis	7 (3%)	Serogrupo E1 Monofásica	2 (0.7%)
Heidelberg	6 (2.3%)	Tennessee	2 (0.7%)
Albany	5 (2%)	Azteca	1 (.3%)
London	5 (2%)	Bareilly	1 (.3%)
Newport	5 (2%)	Serogrupo C2	1 (.3%)
Sinstorf	5 (2%)	Kiambu	1 (.3%)
Muenchen	4 (1.5%)	Mbandaka	1 (.3%)
Serogrupo E1	4 (1.5%)	Morganii	1 (.3%)
Muenster	4 (1.5%)	Salmonella 1	1 (.3%)
Vejle	4 (1.5%)	Sandiego	1 (.3%)
Adelaide	4 (1.5%)	Salmonella 1	1 (.3%)
Havana	4 (1.5%)	Sandiego	1 (.3%)
Serogrupo E4	4 (1.5%)	Urbana	1 (.3%)
Give	3 (1%)	Bredency	1 (.3%)
Oranienburg	3 (1%)	Serogrupo C2 Monofásica	1 (.3%)
Poona	3 (1%)	No hay dato	7 (3%)
Saintpaul	3 (1%)	TOTAL	261 (100%)
Bovismorbificans	3 (1%)	Cepa de referencia	ATCC 14028

Tabla 5. Datos de resistencia a antibióticos		
Antibiótico	Cantidad	%
β-lactámicos	19	7
β-lactámicos + Otros	63	24
Otros	87	33
Sensibles	43	17
Sin registro	49	19
Total de cepas	261	100

6.2 Cultivo de cepas

Las cepas se recuperaron mediante su inoculación en caldo LB (Luria-Bertani), incubando a 37°C por 24 h, del cual se tomó una alícuota para la extracción de ADN. De los cultivos obtenidos se tomó una alícuota para su siembra por estría masiva en agar LB y/o *Salmonella-Shigella*, incubando durante 8 h a 37°C con la finalidad de confirmar que el caldo LB no estuviese contaminado.

6.3 Extracción de ADN

El ADN para los PCR's fue preparado por lisis celular térmica. Brevemente, se centrifugó una alícuota de 1 ml de un cultivo de toda la noche de cada cepa cultivada en caldo LB a 37°C durante 5 min a 10, 000 rpm. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 300 µl de buffer TE (Tris 10 mM [pH 8] y EDTA 0.1 mM). La resuspensión se calentó por 10 min a 95-100°C y se enfrió inmediatamente y se volvió a centrifugar a 12, 000 rpm durante 10 minutos. Como molde para la PCR se utilizaron alícuotas de una dilución 1:10 en agua desionizada estéril ⁽⁹⁴⁾.

6.4 Amplificación por PCR de los genes de resistencia

Para la amplificación de los genes relacionados con la resistencia a β-lactámicos (*bla_{GIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{SPM}* y *bla_{TEM}*) se utilizaron reacciones de 15 µl que contenían 0.4 mM de cada cebador (Tabla 6), 200 mM de cada dNTP, 1 tampón de PCR (Tris-HCl 20 mM [pH 8.4] y KCl 50 mM), 1.5 mM de MgCl₂, 0.75 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen, USA) y 2 µl de ADN. Las amplificaciones se realizaron bajo condiciones específicas para cada uno de los genes estudiados. En detalle se presentan en la Tabla 7.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la detección de los genes *bla*.

Gen	Tamaño del amplicón (pb)	5'→3'	Referencia
<i>bla_{TEM}</i>	1080	F: ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA R:GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC	95
<i>bla_{GIM}</i>	477	F: TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA R: AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	96
<i>bla_{SIM}</i>	570	F: TTA AAG GGA TTC GGC ATC G R:TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	96
<i>bla_{SPM}</i>	271	F: AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG R: ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	96

Tabla 7. Condiciones específicas de las PCR para cada gen *bla*.

Gen	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento de oligonucleótidos	Extensión	Extensión final
<i>bla_{TEM}</i>	94°C	94°C	53°C	72°C	72°C
	7 min	30 seg	30 seg	30 seg	5 min
	30 ciclos				
<i>bla_{GIM}</i>	94°C	94°C	53.5°C	72°C	72°C
	5 min	30 seg	45 seg	1 min	5 min
	36 ciclos				
<i>bla_{SIM}</i>	94°C	94°C	54°C	72°C	72°C
	5 min	30 seg	45 seg	1 min	5 min
	36 ciclos				
<i>bla_{SPM}</i>	94°C	94°C	53.5°C	72°C	72°C
	5 min	30 seg	45 seg	1 min	5 min
	36 ciclos				

6.5 Análisis de resultados

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp 2700 (Applied Biosystems, USA) con los programas ya descritos (Tabla 7), los cuales se obtuvieron con base en las condiciones mencionadas en las referencias antes señaladas, mismas que fueron modificadas para optimizar la amplificación del producto buscado. Todos los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio ⁽⁹⁷⁾ y las imágenes de los geles fueron capturadas con el sistema ChemiDOC (BioRad, USA) y se utiliza la versión 4.5 del software "Quantity One" para la detección de bandas.

Se determinó considerar como cepas portadoras de alguno de los genes a aquellas que el software "Quantity One" detectara la banda con el tamaño de amplicón esperado para cada gen.

Se amplificaron los cuatro genes con el ADN de la cepa de referencia *S. enterica* serotipo Typhimurium (ATCC 14028) como control negativo, y como control positivo las cepas de estudio número 8, 16, 411 y 416 obteniéndose amplicones con el peso molecular esperado para los cuatro genes. Para el gen *bla_{TEM}* se tomó como referencia la cepa de estudio número 8, para el gen *bla_{GIM}* la cepa de estudio número 411, para el gen *bla_{SIM}* la cepa de estudio número 416 y para el gen *bla_{SPM}* la cepa de estudio número 16. Con las condiciones de reacción ya estandarizadas se realizó la amplificación por PCR de los 4 genes asociados a resistencia a β -lactámicos en las 261 cepas de estudio.

Para la relación entre la presencia de genes *bla* con Serotipo/Serogrupo, alimento de origen, municipio de procedencia, fecha en la que se aisló cada cepa (Tiempo) y la resistencia fenotípica, se utilizó la prueba estadística de chi cuadrada de Pearson, considerando como relación positiva cuando el valor de *p* es igual o menor a 0.05 utilizando el programa estadístico informático SPSS versión 20.0.

7. RESULTADOS

7.1 Productos de amplificación por PCR

Al amplificar mediante PCR los genes de resistencia a β -lactámicos *bla*_{TEM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} y *bla*_{SPM} se generaron amplicones de una sola banda del tamaño esperado (Fig. 6).

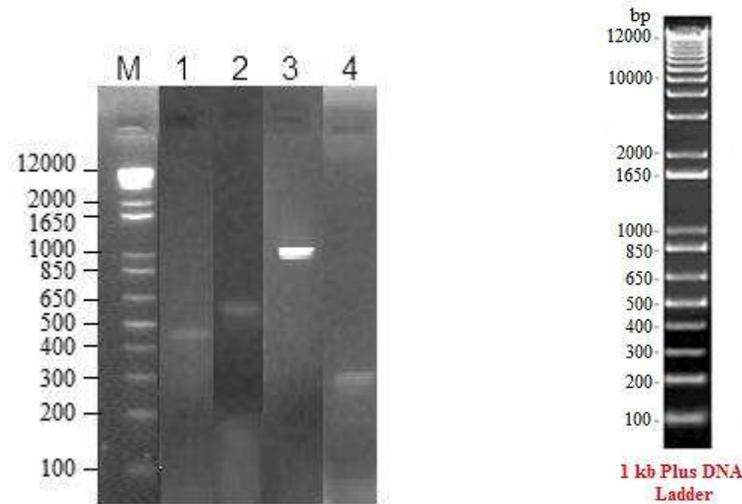


Fig. 6. Productos de amplificación obtenidos para los genes *bla* en las cepas de *S. enterica*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra ejemplos de los productos de amplificación obtenidos para cada una de las regiones genéticas analizadas. Carriles M: marcador de tamaño molecular 1kb DNA plus Ladder, 1, *bla*_{GIM} (cepa 411) (477 pb); 2, *bla*_{SIM} (cepa 416) (570 pb); 3, *bla*_{TEM} (cepa 8) (1080 pb); 4, *bla*_{SPM} (cepa 16) (271 pb). Marcador de tamaño molecular: 1 kb DNA plus Ladder (Invitrogen USA).

De las 261 cepas analizadas, 121 (46%) no presentaron ninguna de las variantes de los genes de resistencia *bla*, mientras que en 140 (54%) cepas se encontró por lo menos uno de los genes. De las 140 cepas positivas a los genes *bla*, el gen *bla*_{TEM} se encontró en 8 cepas, el gen *bla*_{GIM} se encontró en 22 cepas, el gen *bla*_{SIM} en 43 y el gen *bla*_{SPM} en 47 cepas. Se encontraron cepas que tuvieron más de un gen *bla*, para la combinación *bla*_{GIM+SPM} 8 cepas, 2 cepas presentaron *bla*_{TEM+SPM}, 4 cepas *bla*_{SIM+SPM} y *bla*_{GIM+SIM+SPM} en 6 cepas (Fig.7).

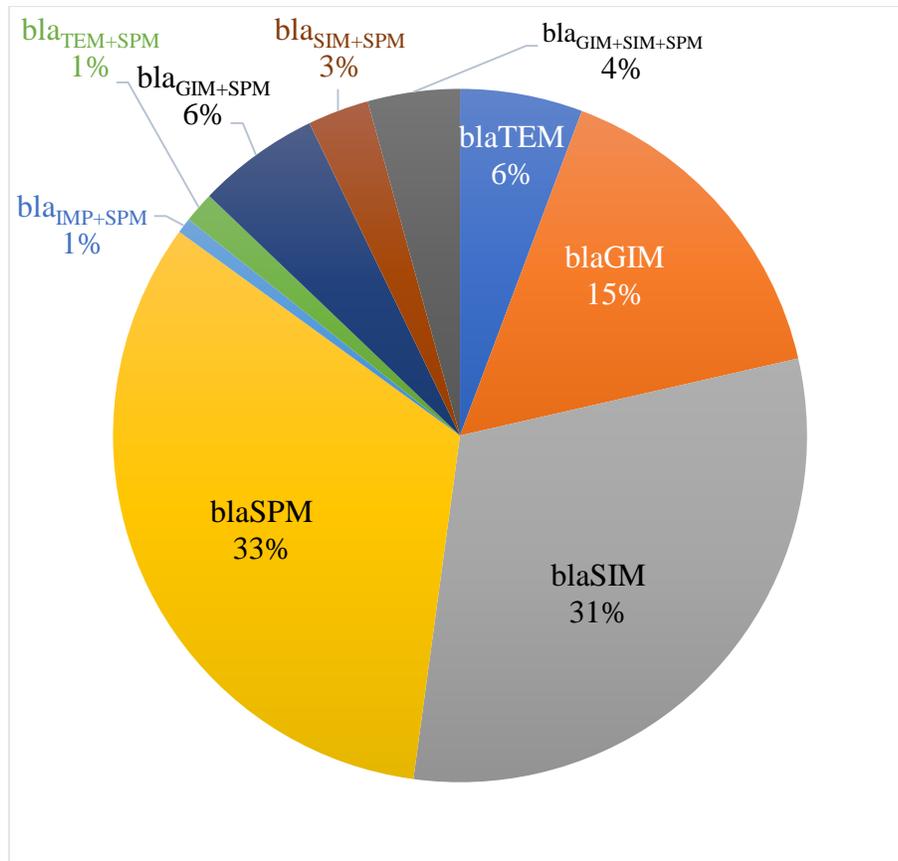


Fig.7. Distribución de la presencia de los genes bla en cepas de S. enterica.

7.2 Distribución de los genes bla en cada Serotipo/Serogrupo de Salmonella enterica

El serotipo Anatum fue el que mostró mayor porcentaje de cepas con presencia de genes con un 11% (16), seguido de Typhimurium, 8.5% (12) y Agona con el 7% (10), mientras que en los otros 18 serotipos se encontró el menor porcentaje de cepas con genes de resistencia, con solo un caso (0.7%) cada uno (Tabla 8).

Tabla 8. Serotipos/Serogrupos de S. enterica con un solo gen bla en una cepa.

Gen	Serotipo
<i>bla_{GIM}</i>	Meleagridis, Bovismorbificans, London
<i>bla_{SIM}</i>	Tennessee, Oranienburg, Saintpaul, Braenderup, Kiambu, Bredency
<i>bla_{SPM}</i>	Serogrupo D Monofásica, Salmonella I, Poona, Reading, Sandiego, Vejle
<i>bla_{TEM+SPM}</i>	Serogrupo C2 Monofásica
<i>bla_{GIM+SPM}</i>	Serogrupo E1

De manera interesante se observó que el serotipo Anatum adicionalmente presentó la mayor diversidad de genes presentando bla_{TEM} , bla_{GIM} , bla_{SIM} , bla_{SPM} y las combinaciones $bla_{TEM} + bla_{SPM}$, $bla_{SIM+SPM}$, $bla_{GIM+SIM+SPM}$; seguido en este rubro del serotipo Agona con los genes bla_{GIM} , bla_{SIM} y bla_{SPM} , además de las combinaciones $bla_{GIM+SPM}$ y $bla_{GIM+SIM+SPM}$. De igual manera, la mayoría de los serotipos presentaron diversidad de genes bla , aun cuando fueron pocas las cepas de cada uno (Fig. 8 y 9).

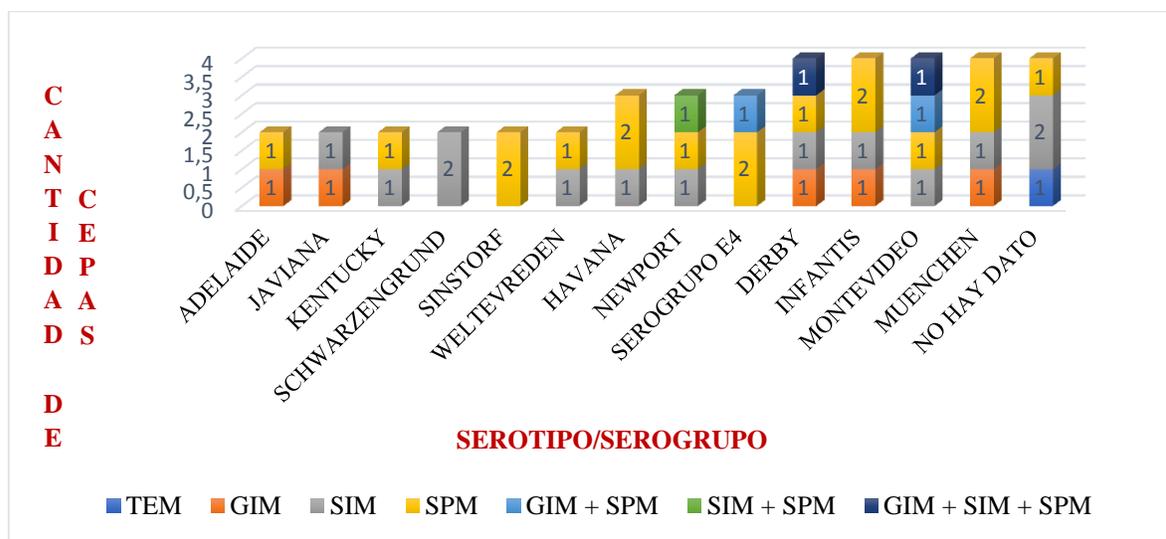


Fig. 8. Número de cepas de *S. enterica* portadoras de genes bla por Serotipo/Serogrupo.

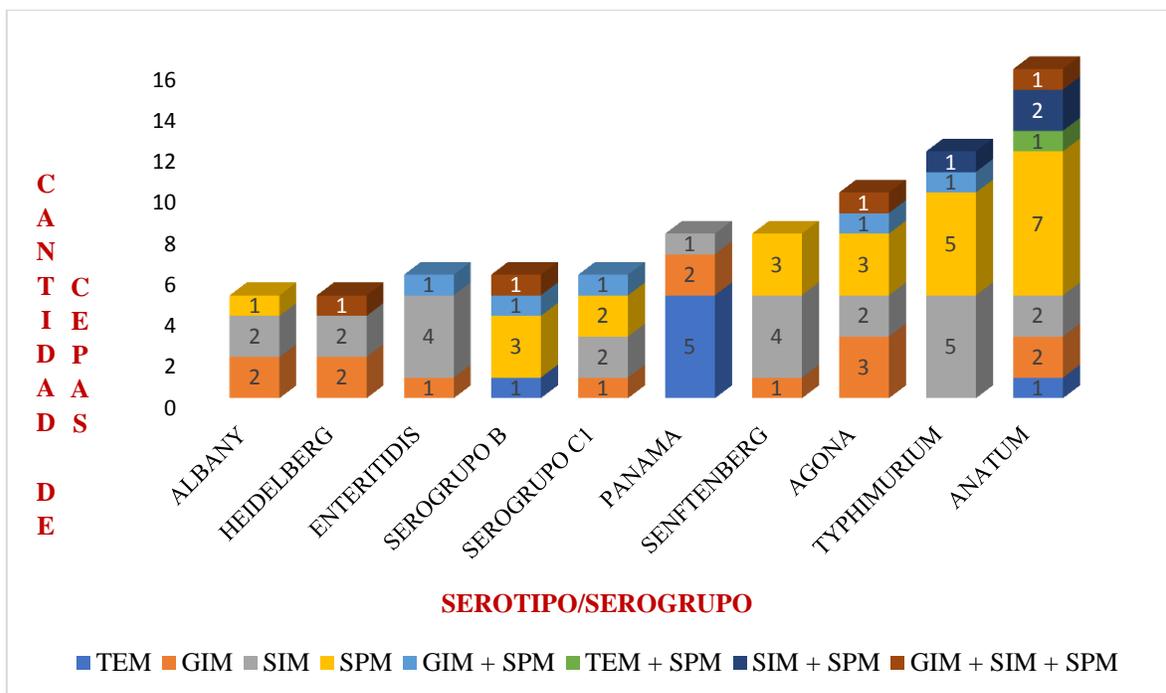


Fig. 9. Número de cepas de *S. enterica* portadoras de genes bla por Serotipo/Serogrupo.

7.3 Distribución de genes *bla* en los alimentos de origen de las cepas de *Salmonella enterica*

La presencia de genes *bla* en relación con el alimento de origen de las cepas, muestra que 36 (26%) cepas aisladas de carne de res portaron al menos uno de los genes *bla* y 11 (8%) cepas obtenidas de diferentes productos alimenticios minoritarios presentaron al menos uno de los determinantes genéticos. En cepas aisladas de carne de res, chorizo y cerdo se encontraron los cuatro genes estudiados *bla_{TEM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{SPM}*. Además, en cepas obtenidas de chorizo se encontraron cuatro combinaciones: *bla_{GIM+SPM}*, *bla_{TEM+SPM}*, *bla_{SIM+SPM}* y *bla_{GIM+SIM+SPM}*. Cepas cuyo alimento de origen fue pollo, bovino y longaniza presentaron los determinantes *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{SPM}*; el gen *bla_{TEM}* no estuvo presente en cepas aisladas de estos alimentos. En las cepas aisladas de queso, pollo y res se encontraron dos combinaciones *bla_{GIM+SPM}*, y *bla_{GIM+SIM+SPM}*. Finalmente, en cepas provenientes de bovino solo se encontró la combinación *bla_{SIM+SPM}* (Fig. 10).

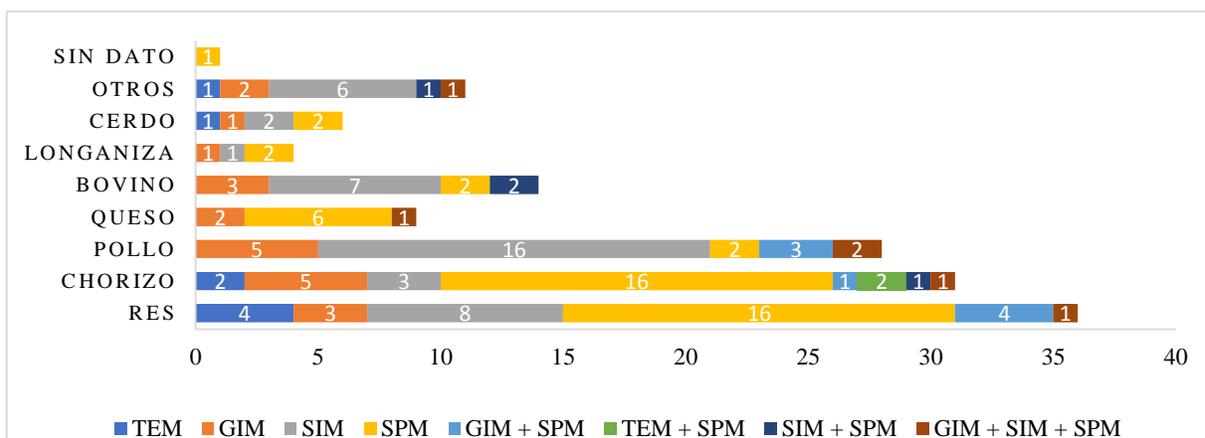


Fig. 10. Distribución de genes *bla* por cada alimento de origen de las cepas.

7.4 Distribución geográfica de los genes de resistencia *bla* en el estado de Michoacán

Al colocar cada gen de resistencia en el mapa del estado de Michoacán de acuerdo al lugar de procedencia de cada una de las cepas analizadas, se observó que la presencia de genes *bla* se concentró en 23 municipios distribuidos ampliamente en el territorio estatal, sin embargo el sureste del estado fue el menos afectado (Fig. 11). El municipio de Lázaro Cárdenas tuvo la mayor cantidad de cepas portadoras de genes *bla*, con un total 36, seguido por los municipios de Morelia y Uruapan con 21 y 13 cepas portadoras respectivamente. Seis

municipios presentaron una cepa portadora de alguno de los genes *bla* y un municipio presentó una cepa con dos genes (0.7 %) (Tabla 9).

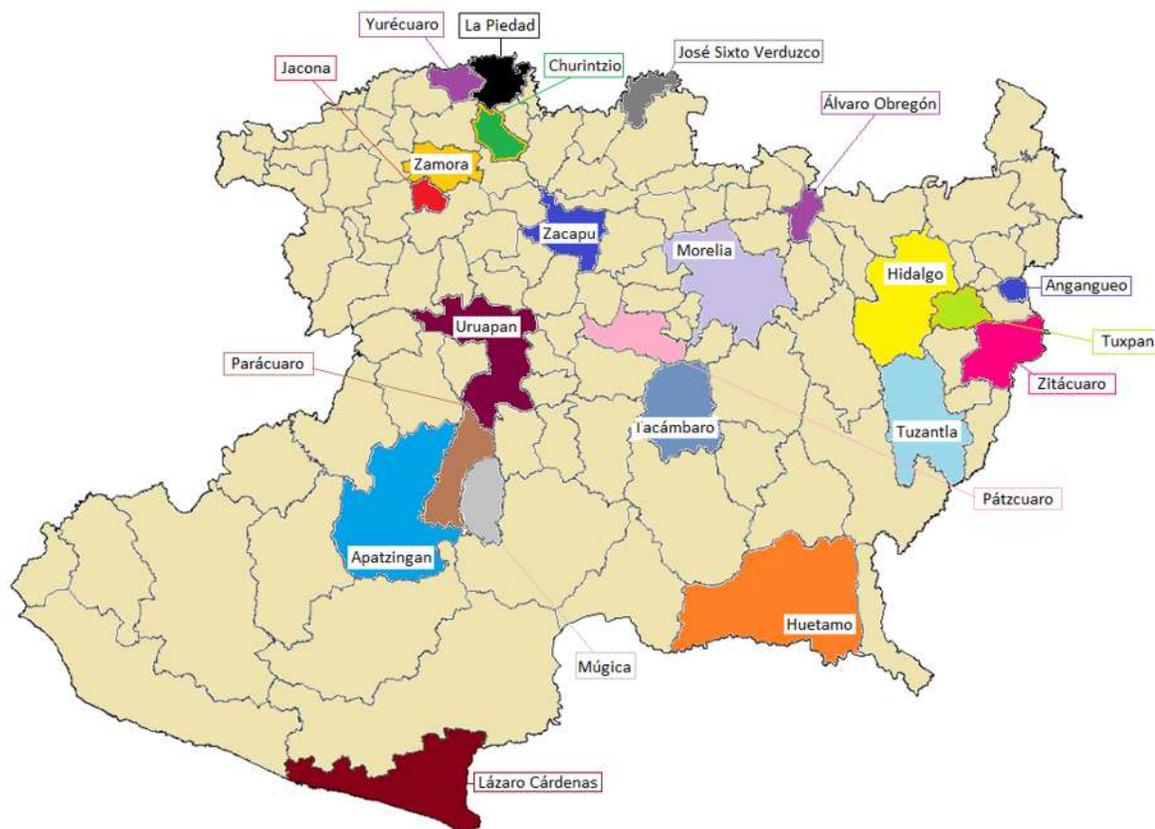


Fig. 11. Distribución de los genes *bla* de cepas de *S. enterica* del estado de Michoacán, periodo 2008-2015.

Tabla 9. Municipios de procedencia de las cepas con un solo gen <i>bla</i>.	
Gen	Municipio
<i>bla</i> _{TEM}	Tuxpan, Churintzio
<i>bla</i> _{GIM}	Parácuaro
<i>bla</i> _{SIM}	Hidalgo
<i>bla</i> _{SPM}	Angangueo, Tuzantla
<i>bla</i> _{TEM+SPM}	José Sixto Verduzco

En los municipios de Lázaro Cárdenas y Morelia se encontró la presencia de los cuatro genes *bla* en las cepas de *S. enterica*. En Morelia se detectaron cepas con las combinaciones *bla*_{GIM+SPM} y *bla*_{GIM+SIM+SPM}. En las cepas obtenidas en Lázaro Cárdenas se identificaron las combinaciones *bla*_{GIM+SPM}, *bla*_{SIM+SPM} y *bla*_{GIM+SIM+SPM}. Las cepas aisladas en Uruapan

presentaron los genes *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{SPM}*, además, en otras cepas del mismo municipio se encontró *bla_{GIM+SPM}*, *bla_{TEM+SPM}*, *bla_{SIM+SPM}* y *bla_{GIM+SIM+SPM}*.

Los municipios de Álvaro Obregón, La Piedad, Zacapu y Yurécuaro presentaron cada uno dos cepas con el mismo gen, *bla_{SIM}* en el caso de los tres primeros y *bla_{SPM}* para Yurécuaro; Múgica presentó una cepa con el gen *bla_{SPM}* y una cepa con la combinación *bla_{GIM+SPM}*; en el municipio de Tacámbaro se encontró una cepa con *bla_{SIM}* y una cepa con *bla_{SPM}*. En Jacona se detectaron tres cepas con el gen *bla_{SIM}* y una cepa con *bla_{SPM}* y en dos cepas obtenidas en Zitácuaro se detectó *bla_{GIM}* y cuatro cepas *bla_{SIM}*. Las cepas aisladas en Huetamo tuvieron la presencia de los genes *bla_{SIM}*, *bla_{SPM}* y la combinación *bla_{GIM+SPM}*; en diferentes cepas originarias de Zamora se presentaron los cuatro genes; Apatzingán y Pátzcuaro no presentaron cepas con el gen *bla_{TEM}*, sin embargo, dos cepas originarias de Apatzingán y una cepa aislada en Pátzcuaro tuvieron la combinación *bla_{GIM+SIM+SPM}*, además, Pátzcuaro presentó cepas con las combinaciones *bla_{GIM+SPM}* y *bla_{SIM+SPM}* (Fig. 12).

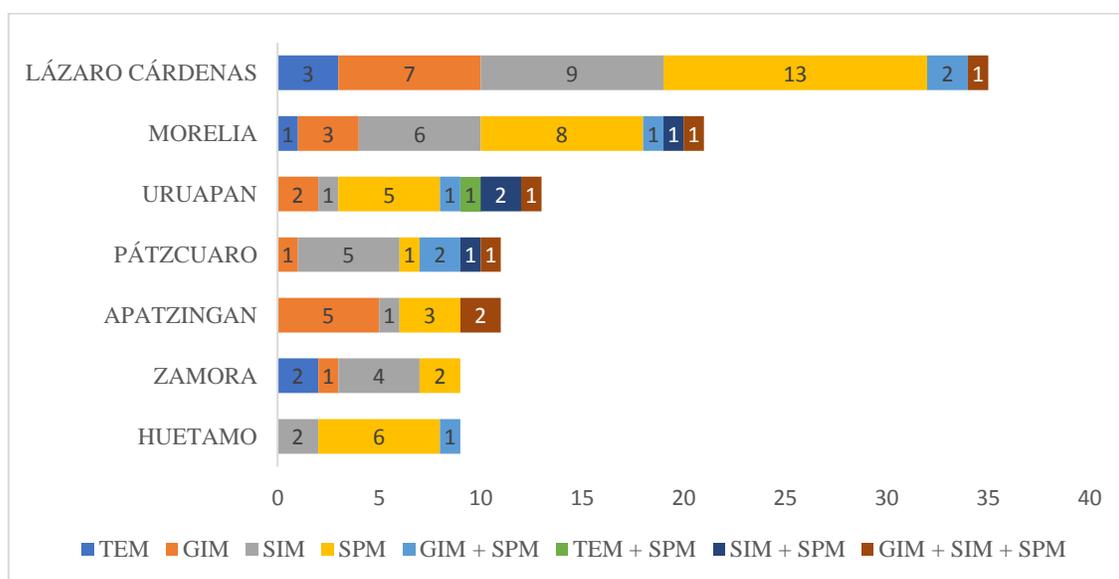


Fig. 12. Municipios con mayor presencia de genes de resistencia a β -lactámicos.

7.5 Distribución por año de aislamiento de las cepas de *S. enterica*

Por otro lado, 73 (52%) de las cepas que presentaron por lo menos uno de los genes *bla* fueron aisladas en el año 2013, 21 (15%) en 2011, 19 (14%) en 2010, 14 (10%) en 2009, 11 (8%) en 2008 y dos de los cuales no se tiene el dato.

En el año 2008 se encontraron cepas de *Salmonella enterica* que presentaron únicamente el gen bla_{SPM} ; en 2009 se encontraron cepas con los genes bla_{TEM} , bla_{SIM} o bla_{SPM} . En los años 2010 y 2011 no se detectaron cepas portadoras de bla_{SIM} ni las combinaciones $bla_{SIM+SPM}$ y $bla_{GIM+SIM+SPM}$. El gen bla_{GIM} se presentó en cepas aisladas en el periodo 2010-2013. En las cepas aisladas en el año 2013 se encontraron, además, bla_{SPM} y se detectó de nuevo el gen bla_{SIM} , y tres combinaciones: $bla_{GIM+SPM}$, $bla_{SIM+SPM}$ y $bla_{GIM+SIM+SPM}$ (Fig. 13).

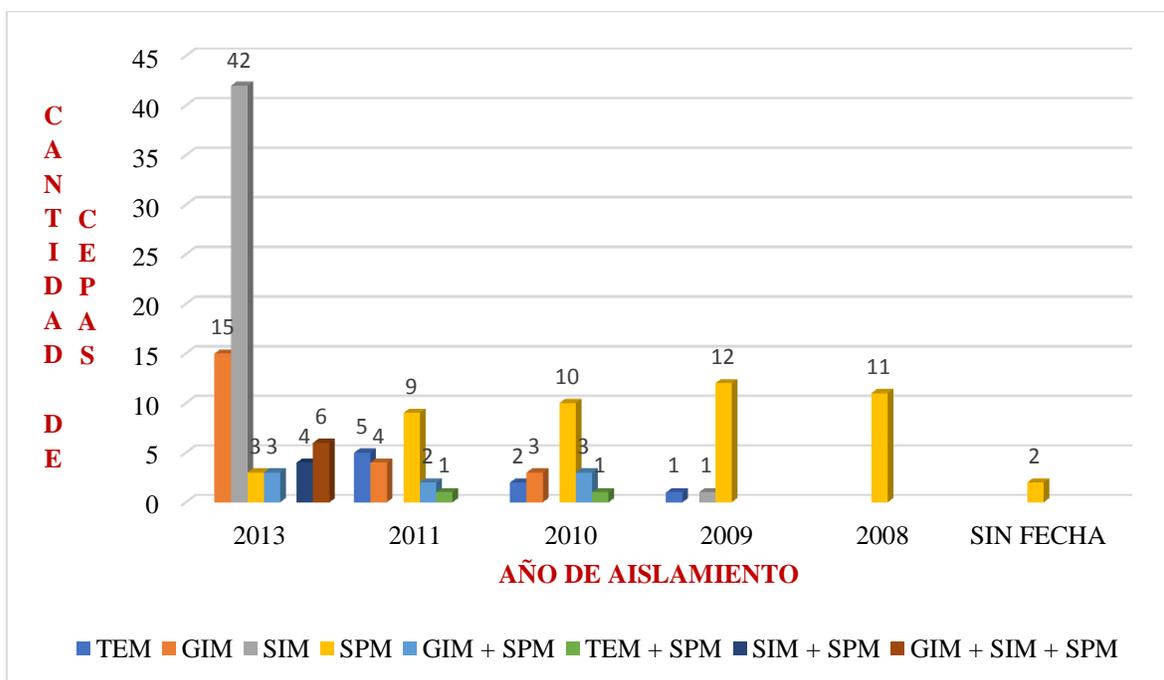


Fig. 13. Distribución de genes *bla* por año de aislamiento de las cepas de *S. enterica*.

7.6 Relación entre la presencia de genes *bla* con la resistencia fenotípica

Para encontrar la relación entre la presencia de genes de resistencia a β -lactámicos y la resistencia fenotípica presentada por las cepas de *Salmonella enterica* se dividió en cinco categorías los perfiles de resistencia encontrados (Fig. 14):

Sin Registro: cepas de las que no se tiene la información sobre la resistencia fenotípica.

Sensibles: cepas que no presentaron resistencia a ninguno de los antibióticos analizados.

Otros: cepas que presentaron resistencia a familias distintas a los β -lactámicos, tales como cloranfenicol, nitrofurantoina, trimetoprim/sulfametoxazol, aminoglucósidos

(amikacina, gentamicina, tobramicina, netilmicina) y fluoroquinolonas (norfloxacino, moxifloxacino, ciprofloxacino, levofloxacino).

β -lactámicos + Otros: cepas resistentes a familias de β -lactámicos y otras familias de antibióticos.

β -lactámicos: cepas con resistencia únicamente a la familia de β -lactámicos.

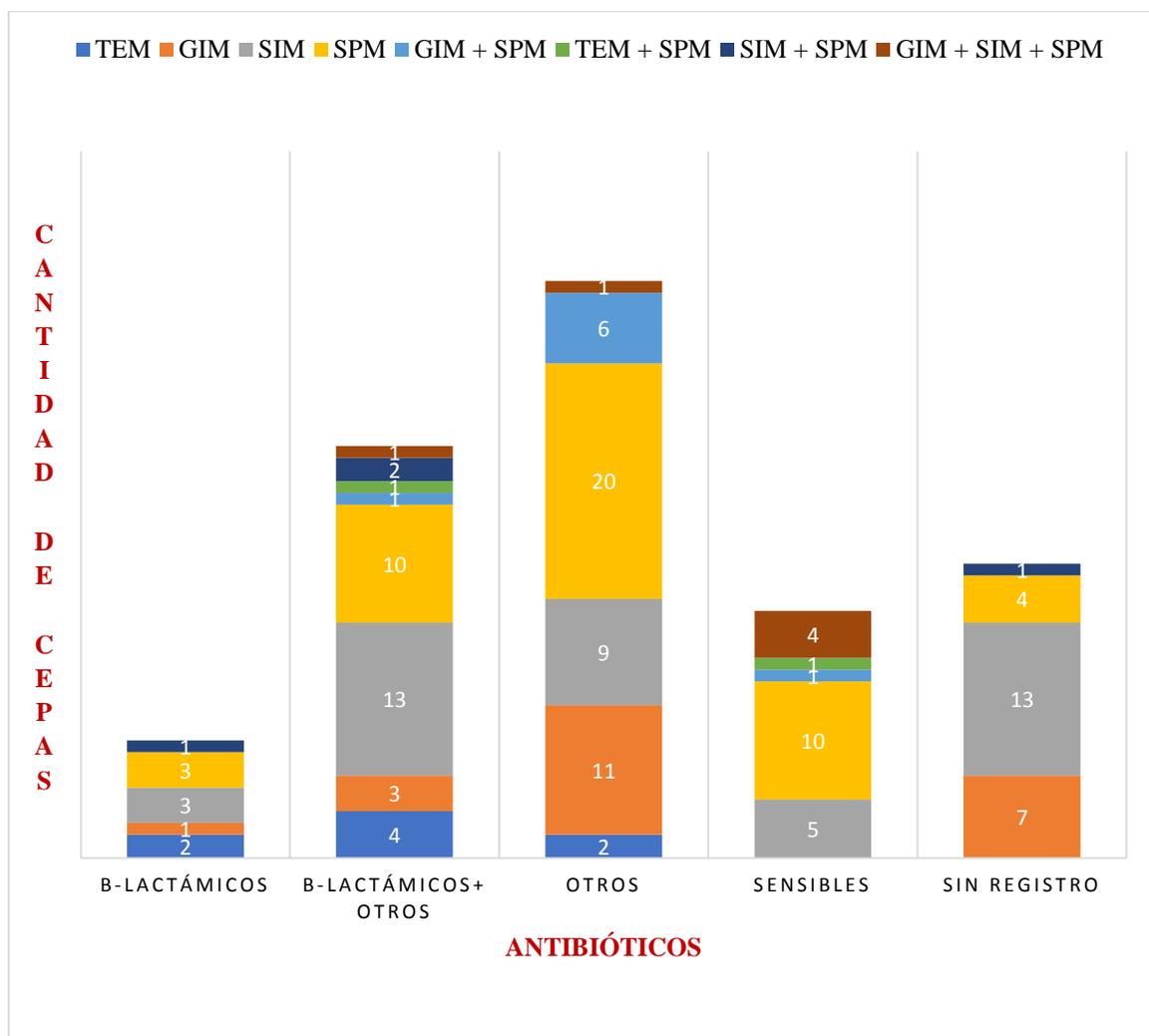


Fig. 14. Resistencia fenotípica de cepas de *Salmonella enterica* en relación con la presencia de genes *bla*.

En las cepas con sensibilidad fenotípica se encontraron los genes *bla_{SIM}*, *bla_{SPM}* y 3 combinaciones, los genes *bla_{GIM}* y *bla_{TEM}* no se encontraron en forma solitaria. Es interesante que la mayor cantidad de genes *bla* se encontró en cepas que no presentaron resistencia a β -lactámicos. Los casos de cepas de *Salmonella enterica* con resistencia a la familia de β -

lactámicos y otras familias de antibióticos son menos que la anterior categoría. Solo hay 10 casos de cepas con resistencia fenotípica a β-lactámicos que presentaron los genes *bla*, dos cepas con el gen *bla_{TEM}*, una cepa con *bla_{GIM}*, tres con *bla_{SIM}*, tres para *bla_{SPM}* y un caso con la combinación *bla_{SIM+SPM}*. En las Tablas 10 y 11 se muestra la resistencia a antibióticos no β-lactámicos y β-lactámicos mostradas en las cepas estudiadas.

Tabla 10. Resistencia a antibióticos no β-lactámicos

Gen	CL	NF	SXT	GE	AK	NET	NN	NOF	LEV	ENR	MXF	CIP
<i>bla_{TEM}</i>	3	4	4	2	2	1		2				
<i>bla_{GIM}</i>	3	7	11	2	3	1		1			1	1
<i>bla_{SIM}</i>	2		21	2	1				2	1	8	3
<i>bla_{SPM}</i>	17	14	19	8	6	5		1				
<i>bla_{GIM+SPM}</i>	2	2	5			1		1				1
<i>bla_{SIM+SPM}</i>			2			1					1	1
<i>bla_{GIM+SIM+SPM}</i>			1	1			1					

CL= Cloranfenicol NF= Nitrofurantoina SXT= Trimetoprim/Sulfametoxazol GE= Gentamicina
 AK= Amikacina NET= Netilmicina NN= Tobramicina NOF= Norfloxacin LEV= Levofloxacin
 ENR= MXF= Moxifloxacin CIP= Ciprofloxacino

Tabla 11. Resistencia a β-lactámicos

Gen	SAM	AM	ATM	CB	CF	CRO	CTX	CZ	TICC	TZP
<i>bla_{TEM}</i>		5		6						
<i>bla_{GIM}</i>	2	3		1				2		
<i>bla_{SIM}</i>	7	11	4					1	3	1
<i>bla_{SPM}</i>		8		11	7	2	2			
<i>bla_{TEM+SPM}</i>					1					
<i>bla_{GIM+SPM}</i>		1		1						
<i>bla_{SIM+SPM}</i>	1	3								
<i>bla_{GIM+SIM+SPM}</i>		1								

Ampicilina (AM), Aztreonam (ATM), Carbenicilina (CB), Cefalotina (CF), Ceftriaxona (CRO), Cefotaxima (CTX), Cefazolina (CZ), Ampicilina/Sulbactam (SAM), Ampicilina/Tazobactam (TZP), Ticarcilina/Ácido Clavulánico (TICC)

De las 261 cepas de *Salmonella enterica*, 9 cepas presentaron resistencia fenotípica solo hacia antibióticos de la familia de β-lactámicos y 28 a β-lactámicos y otras familias de antibióticos, las cuales no presentaron ninguno de los genes *bla* estudiados.

7.7 Análisis estadístico

Para determinar si las diferencias numéricas obtenidas eran significativas y determinar si existe o no una relación entre la presencia de alguno de los genes de resistencia a β -lactámicos (*bla*) y sus combinaciones con la resistencia fenotípica, el serotipo/serogrupo, alimento de origen, municipio de procedencia o el año de aislamiento, se utilizó la prueba estadística χ^2 de Pearson (chi cuadrada).

De las 140 cepas que presentaron alguno de los genes *bla*, se descartaron aquellas con información incompleta sobre su Serotipo/Serogrupo, alimento de origen, municipio de procedencia, año de aislamiento o patrón de resistencia, por lo que el análisis estadístico se realizó con 111 datos. Se utilizó un valor de $\alpha = 0.05$.

Tabla 12. Resumen del procesamiento de los datos

DATOS					
Válidos		Perdidos		Total	
N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
111	100.0%	0	0.0%	111	100.0%

En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos del programa estadístico para diversas posibles relaciones entre Gen-Serotipo, Gen-Alimento, Gen-Tiempo, Gen-Resistencia y Gen-Municipio.

Tabla 13. Pruebas de chi-cuadrada

	Gen <i>bla</i> -	Gen <i>bla</i> _{TEM}	Gen <i>bla</i> _{GIM}	Gen <i>bla</i> _{SIM}	Gen <i>bla</i> _{SPM}
Serotipo	.581	.043	.607	.367	.282
Alimento	.001	.076	.508	.107	.042
Municipio	.007	.002	.569	.091	.475
Tiempo	.000	.026	.269	.000	.000
Resistencia	.020	.103	.068	.395	.464
		<i>bla</i> _{TEM+SPM}	<i>bla</i> _{GIM+SPM}	<i>bla</i> _{SIM+SPM}	<i>bla</i> _{GIM+SIM+SPM}
Serotipo		.006	.759	1.000	.994
Alimento		.933	.882	.000	.494
Municipio		.000	.932	.818	.946
Tiempo		.416	.325	.400	.080
Resistencia		.490	.315	.117	.023

Tabla 14. Relaciones estadísticamente significativas						
Gen <i>bla</i>-	Gen <i>bla</i>_{TEM}	Gen <i>bla</i>_{SIM}	Gen <i>bla</i>_{SPM}	<i>bla</i>_{SIM+SPM}	<i>bla</i>_{TEM+SPM}	<i>bla</i>_{GIM+SIM+SPM}
Alimento	Serotipo	Tiempo	Alimento	Alimento	Serotipo	Resistencia
Municipio	Municipio		Tiempo		Municipio	
Tiempo	Tiempo					
Resistencia						

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la presencia de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} y *bla*_{SPM} relacionados con la resistencia a β -lactámicos en cepas de *Salmonella enterica* obtenidas principalmente de alimentos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán durante el periodo 2008-2015.

La resistencia a β -lactámicos en *S. enterica* se debe principalmente a la adquisición de enzimas betalactamasas⁽⁵³⁾. Una de las más detectadas globalmente es la codificada por el gen *bla*_{TEM} y sus variantes^(21,54); sin embargo, en México *bla*_{SHV-5} y *bla*_{CTX-M-15} son las más frecuentemente encontradas⁽³⁰⁾. En el caso de *S. enterica* serotipo Typhimurium, se han encontrado betalactamasas codificadas por el gen *AmpC*^(78,79), cepas portadoras del gen *bla*_{CMY-2}⁽⁸⁷⁾ y en menor cantidad *bla*_{TEM-1}⁽⁷⁹⁾, esto también se ha observado ya en otros estudios^(63,69,75), por lo que ya no es extraño que en este estudio el gen *bla*_{TEM} se haya encontrado en menor porcentaje que los demás genes estudiados con un 6% (Fig. 7). Por otro lado, *bla*_{TEM} ha sido mayormente reportado en cepas de *Salmonella* aisladas de pollos⁽⁷²⁾, contrastando con este trabajo donde no se detectó en ninguna cepa procedente de este alimento (Fig. 10). Se ha reportado la presencia del gen *bla*_{TEM} en cepas que son resistentes a ampicilina⁽⁷¹⁾, lo cual coincidió con lo encontrado en este estudio, que muestra que 75% de las cepas portadoras de este gen son resistentes a diversos antibióticos de la familia de β -lactámicos, incluida ampicilina para el 62%. El 25% fue resistente, pero no a antibióticos β -lactámicos. Estudios previos encuentran a *bla*_{TEM} en combinación con diversos genes que confieren resistencia a β -lactámicos^(64-67, 74); en este caso solo se encontró en dos cepas junto con el gen *bla*_{SPM} (Fig. 14, Anexo A).

En el caso de las metalobetalactamasas, la única encontrada en México, hasta ahora es IMP y no en el género *Salmonella*⁽⁴⁷⁾. La bibliografía revisada acerca de los genes *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} y *bla*_{SPM} señala que para los dos primeros solo se han encontrado en aislados clínicos de géneros como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Acinetobacter* y *bla*_{SPM} en *Acinetobacter* y en aislados de *P. aeruginosa* provenientes de ríos^(45, 47-48, 50-52). Ni *bla*_{GIM} ni *bla*_{SPM} se ha reportado fuera del área geográfica en donde fueron identificados por primera vez, Alemania y Brasil, respectivamente, aunque sí se reporta que se han expandido en esos territorios^(47-49,52). El gen *bla*_{SIM} se ha encontrado en Corea y China solamente; también se ha reportado en combinación con el gen *bla*_{OXA}⁽⁵⁰⁾. En el presente trabajo se encontraron los tres

genes que codifican metalobetalactamasas en cepas de *S. enterica* estudiadas, el gen que se detectó en mayor cantidad de cepas fue *bla_{SPM}*, además de las combinaciones con los genes *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}* y *bla_{TEM}*; seguido de *bla_{SIM}* y *bla_{GIM}* (Fig. 7). El gen *bla_{GIM}* fue encontrado en 16 serotipos diferentes de cepas de 9 alimentos distintos, en un área geográfica de 8 municipios a través de los años 2010-2013; por otro lado, *bla_{SIM}* se distribuyó en 25 serotipos, 6 alimentos 14 municipios y solo en los años 2009 y 2013, aunque en combinación con otros genes sí se encontró en los años 2010 y 2011; mientras que *bla_{SPM}* fue encontrado en 25 serotipos provenientes de 7 alimentos con una distribución geográfica de 13 municipios a lo largo de los años 2008 al 2013 (Anexo A).

En el estado de Michoacán son pocos los estudios sobre la resistencia a antibióticos y los determinantes genéticos relacionados con ella en cepas de *S. enterica*, uno de los más recientes estuvo enfocado en el estudio de los genes *tet* y *sul*, los cuales confieren resistencia a tetraciclinas y sulfonamidas respectivamente ⁽⁹³⁾. Puesto que los genes de resistencia a β -lactámicos se encuentran a menudo en integrones ⁽⁴⁶⁾, al igual que los genes *tet* y *sul* el estudio antes mencionado permitió sentar precedentes acerca del comportamiento que se podía esperar en las cepas de *S. enterica*, en primer lugar, que un porcentaje superior al 30% de las cepas fuera portadora de al menos uno de los genes estudiados y que la presencia de genes de resistencia mostrara una amplia distribución geográfica dentro del estado, además, que se mostrara una variación considerable de combinaciones de genes de resistencia a antibióticos en las cepas de *S. enterica* y, por último, que la incidencia de los genes estudiados fuera diferente a la reportada en distintas partes del mundo.

Los resultados obtenidos en este estudio corroboran lo antes mencionado, el porcentaje de cepas que presentó al menos uno de los genes de resistencia superó el 30%, la distribución geográfica de los determinantes genéticos fue amplia en el territorio michoacano, hubo variación en la combinación de los genes, se encontraron cuatro combinaciones diferentes y, finalmente, que las incidencia reportada para cada uno de los genes en México y en el mundo fue diferente en el presente trabajo.

Además, para este estudio se utilizó la prueba estadística χ^2 para evaluar ciertas relaciones para 111 datos, donde se obtuvieron 16 relaciones con un valor de $\alpha < 0.05$. A partir de los resultados obtenidos se estableció hay una relación positiva entre la presencia de gen *bla_{TEM}* o la presencia de *bla_{TEM+SPM}* con el serotipo del cual se obtuvieron las cepas de *S.*

enterica portadoras. Hubo una relación positiva entre la presencia de cualquier gen *bla*, la presencia particular de *bla_{SIM}* o *bla_{SPM}*, o la combinación de éstos y el alimento de origen de las cepas de *S. enterica* en las que se encontraron los genes. Hasta el momento no se han reportado las relaciones anteriores en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos. También se encontró una relación positiva entre la presencia de alguno de los genes de resistencia a β -lactámicos aquí estudiados, la presencia del gen *bla_{TEM}*, *bla_{SIM}* o la combinación *bla_{TEM+SPM}* y el municipio en el cual fueron aisladas las cepas portadoras, esto coincidió con la literatura que asegura que los genes de resistencia están confinados a ciertas regiones geográficas. Otra relación positiva fue entre el año en el cual se realizaron los aislados y la presencia de cualquiera de los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SIM}* o *bla_{SPM}* (Tabla 14).

Finalmente, en lo tocante a la resistencia fenotípica y su relación con la presencia de genes de resistencia, todas las cepas que presentaron el gen *bla_{TEM}*, fueron resistentes fenotípicamente tanto a los antibióticos β -lactámicos como a otras familias de antibióticos; en el caso del gen *bla_{GIM}* el 60% de las cepas portadoras son resistentes a familias de β -lactámicos y/o otras familias. Los casos de las cepas con los genes *bla_{SIM}* y *bla_{SPM}* son similares, solo que el 10% y el 20%, respectivamente de las cepas portadoras se encontraron sensibles. Las cuatro combinaciones de genes encontradas presentaron al menos un caso resistente a β -lactámicos y otras familias de antibióticos, solo la cepa con la combinación *bla_{SIM+SPM}* fue resistente solo a β -lactámicos; un caso con la combinación *bla_{GIM+SIM+SPM}*, y seis cepas con *bla_{GIM+SPM}* fueron resistentes pero no a β -lactámicos y finalmente, 6 cepas fueron sensibles, una con *bla_{GIM+SPM}*, una con *bla_{TEM+SPM}* y cuatro con *bla_{GIM+SIM+SPM}*. Todo lo anterior da la pauta a pensar que existe una relación positiva entre la presencia de los genes *bla* y su resistencia fenotípica a β -lactámicos, lo cual se confirmó con el análisis estadístico (Tabla 14). Por otro lado, hubo cepas resistentes fenotípicamente y no presentaron ninguno de los genes de resistencia que aquí se buscaron, una probable explicación es la posibilidad de que estas cepas tengan algún otro gen que no fue estudiado. Además, es importante mencionar que la resistencia a antibióticos es el resultado de una combinación de mecanismos, por lo que el hecho de que las cepas porten o no alguno de los genes no necesariamente es la única fuente que les confiere resistencia fenotípica.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

261 cepas analizadas	MAYOR NÚMERO DE CEPAS EN:						
	Serotipo	Alimento	Municipio	Año	Resistencia		
	Anatum	Res	Lázaro Cárdenas	2013	No β-lactámicos		
	Typhimurium	Chorizo	Morelia	2011	β-lactámicos y noβ-lactámicos		
Agona	Pollo	Uruapan	2010	β-lactámicos			
141 cepas portadoras de genes <i>bla</i>	MAYORÍA DE CEPAS EN:						
	Gen	CEPAS	Serotipo	Alimento	Municipio	Año	Resistencia
	<i>bla_{TEM}</i>	8	Panama	Res	Lázaro Cárdenas	2011	β-lactámicos y no β-lactámicos
	<i>bla_{GIM}</i>	22	Agona	Chorizo y pollo	Lázaro Cárdenas	2013	Otras familias
	<i>bla_{SIM}</i>	43	Typhimurium	Pollo	Lázaro Cárdenas	2013	β-lactámicos y no β-lactámicos
	<i>bla_{SPM}</i>	47	Anatum	Res y pollo	Lázaro Cárdenas	2009	Otras familias
	<i>bla_{TEM+SPM}</i>	2	Anatum y Serogrupo C2 monofásica	Chorizo	Uruapan y José Sixto V.	2010 y 2011	β-lactámicos y no β-lactámicos
	<i>bla_{GIM+SPM}</i>	8	8 serogrupos diferentes	Res	Pátzcuaro y Lázaro Cárdenas	2010 y 2013	No β-lactámicos
	<i>bla_{SIM+SPM}</i>	6	Anatum	Bovino	Uruapan	2013	β-lactámicos y no β-lactámicos
	<i>bla_{GIM+SIM+SPM}</i>	6	6 serogrupos diferentes	Pollo	Apatzingán	2013	Sensibles

RELACIONES POSITIVAS
Gen <i>bla</i> -Alimento
Gen <i>bla</i> -Municipio
Gen <i>bla</i> -Tiempo
Gen <i>bla</i> -Resistencia
Gen <i>bla_{TEM}</i> -Serotipo
Gen <i>bla_{TEM}</i> -Municipio
Gen <i>bla_{TEM}</i> -Tiempo
Gen <i>bla_{SIM}</i> -Tiempo
Gen <i>bla_{SPM}</i> -Tiempo
Gen <i>bla_{TEM+SPM}</i> -Serotipo
Gen <i>bla_{TEM+SPM}</i> -Municipio
Gen <i>bla_{SIM+SPM}</i> -Alimento
Gen <i>bla_{GIM+SIM+SPM}</i> -Resistencia

10. CONCLUSIÓN

En cuanto a lo abordado con anterioridad en este trabajo, se concluyó que si existe variación de combinaciones de genes de resistencia a β -lactámicos en las cepas que se estudiaron, además, la incidencia de los distintos genes *bla* encontrados difiere parcialmente de los reportados para otras enterobacterias y en específico para cepas de *S. enterica* obtenidas de alimentos en distintas partes del mundo. Finalmente, se observó que, estadísticamente, existe una relación positiva entre la presencia de genes de resistencia y el fenotipo de resistencia/sensibilidad de las cepas de estudio, aunque existen excepciones a dicha relación, lo que permite aceptar la hipótesis planteada al inicio de este trabajo.

11. REFERENCIAS

1. Taxonomy [Internet]. Bethesda (MD): U.S. National Library of Medicine. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>
2. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, Di_Francesco P, Angiolella L. *Microbiologia medica*. Milano: Edra; 2017.
3. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-Non-Susceptible Enterobacteriaceae in Europe : Conclusions from a Meeting of National Experts. *Euro Surveill*. 2010; 15(46).
4. Andino A, Hanning I. *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*. 2015.
5. Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A. A Comprehensive Review of Non-Enterica Subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*. 2018; 206: 60–73.
6. Figueroa-Ochoa IM, Verdugo-Rodríguez A. Mecanismos Moleculares de Patogenicidad de *Salmonella spp*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2005; 47 (1–2): 25–42.
7. Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, et al. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*. 2012. 8 (6): 4.
8. World Health Organization. Enfermedades de transmisión alimentaria [Internet]. 2018. Available from: http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/
9. Hernández Cortez C, Aguilera Arreola MG, Castro Escarpulli G. Situación de Las Enfermedades Gastrointestinales En México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2011; 31 (4): 137–51.
10. Ruiz Matus C. 2017. Enfermedades Transmitidas Por Alimentos. [Internet0]. 2017. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225246/3_Enfermedades_Transmitidas_por_Alimentos_-DGE.pdf.
11. World Health Organization. Salmonellosis [Internet]. 2018. <http://www.who.int/topics/salmonella/es/>
12. World Health Organization. Salmonella (no tifoidea) [Internet]. 2018. Available from: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
13. Errecalde J. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2004.
14. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18:268-81.
15. Vignoli R, Seija V. Principales Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2000; 649–62.
16. Canton R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 35: 977-91.
17. Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 35:790-819.

18. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35:736-55.
19. Schechner V, Temkin E, Harbarth S, Carmeli Y, Schwaber MJ. Epidemiological interpretation of studies examining the effect of antibiotic usage on resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26:289-307.
20. Madigan MT, Martinko JM; Dunlap PV; Clark DP. Fundamentos de genética bacteriana. Brock: Biología de los Microorganismos. 12ed. España. Pearson Education, S.A.; 2009. 310-343.
21. De Toro M, Seral C, Rojo-Bezarez B, Torres C, Castillo FJ, Sáenz Y. Resistencia a Antibióticos y Factores de Virulencia En Aislados Clínicos de *Salmonella enterica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2014; 32(1):4–10.
22. Anton Y, Peleg MB, BS, M.P.H, David C. Hooper, M.D. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med.* 2010; 362 (19): 1804–13.
23. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(10):692–699.
24. Medina-Morales DA, Machado-Duque ME and Machado-Alba JE. Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Rev. Méd. Risaralda* 2015; 21 (1):74
25. Fernández RF, López HJ, Ponce ML and Machado BC., Resistencia Bacteriana. *Rev Cubana Med Milit* 2003; 32(1):44-8
26. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis.* 2006; 42 (Suppl.2):82-9.
27. Rivera-Jacinto MA. Betalactamasas de Espectro Extendido En Cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* Aisladas de Reservorios Inanimados En Un Hospital Del Norte Del Perú. *Revista Española de Quimioterapia.* 2012; 25 (2): 161–63.
28. Wolff RM. Uso y Abuso de Antibióticos: Momento de Su Evaluación, Más Allá Del Ser Humano. *Revista Médica de Chile.* 2004; 132(8):909–11.
29. Cabello FC, Bravo S, Dözl H, Silva MT, Lagos C, Millanao A, Urbina M. Diagnóstico Del Uso de Fármacos y Otros Productos químicos En La Acuicultura. *Revista Médica de Chile.* 2004; 132 (8): 1001–6.
30. Rodríguez E, León G, Petersen S, Pérez HR, González E, Morfín R. La Evolución de La Resistencia Bacteriana En México, 1973-2013. *Biomédica.* 2014; 34:181–90.
31. Hernández BB, Hernández-Godoy J. Resistencias a Antibióticos En *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* Aislados de Alimentos de Origen Animal. *Revista de Salud Ambiental.* 2004; 4 (1–2): 42–46.
32. Casellas JM. Resistencia a Los Antibacterianos En América Latina: Consecuencias Para La Infectología. *Revista Panamericana de Salud Pública.* 2011; 30 (6): 519–28.
33. Saúde C. Enterobacterias productoras de carbapenemasas - Consellería de Sanidade - Servizo Galego de Saúde [Internet]. Sergas.es. 2018 [cited 20 August 2018]. Available from: <https://www.sergas.es/Saude-publica/Enterobacterias-productoras-de-carbapenemasas?idioma=es>
34. Rivera-Corona MS, Granda AE, Felipe L, Bonachea H. Resistencia Antimicrobiana En Cepas de *Salmonella enterica* Subsp. Enterica Aisladas En Carnes de Aves Importadas. *Rev. Salud Anim.* 2012; 34(2): 120–26.
35. Volfredo, J. Los Antimicrobianos En La Práctica Médica. 2010.

36. Seija V, Vignoli R. Principales Grupos de Antibióticos. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2006; 631–47.
37. Marín M, Gudiol F. Antibióticos Betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21 (1): 42–54.
38. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos Betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2009; 27 (2): 116–29.
39. Gómez J, García-Vázquez E, Hernández-Torres A. Los Betalactámicos En La Práctica Clínica. Rev Esp Quimioter. 2015; 28(1):1-9.
40. Moreno Monge KM. 2013. Carbapenémicos: Tipos y Mecanismos de Resistencia Bacterianos. Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica. 2013; 608:599–605.
41. Morejón García M. Betalactamasas de espectro extendido. Revista Cubana de Medicina. 2013; 52(4): 272–80.
42. Abarca G, Herrera ML. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. Rev Med Hosp Nac Niños. 2001; 36(1-2):77-104.
43. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(6): 1211-33.
44. Castro LT, Torres MI, Castañeda LM, López DP, Prada CF. Caracterización fenotípica de bacilos Gram negativos con betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. Revista Investig. Salud Univ. Boyacá. 2015; 2:116-130
45. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The Versatile β -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews. 2007; 20(3): 440–58.
46. López-Velandia DP, Torres-Caycedo MI, Prada- Quiroga CF. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. Rev Univ. Salud. 2016; 18(1):190-202.
47. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. 2011. Metallo- β -Lactamases: A Last Frontier for β -Lactams? The Lancet Infectious Diseases.2011; 11 (5): 381–93.
48. Wendel AF, Brodner AHB, Wydra S, Ressina S, Henrich B, Pfeffer K, Toleman MA, MacKenzie CR. Genetic Characterization and Emergence of the Metallo- β -Lactamase GIM-1 in *Pseudomonas spp.* and *Enterobacteriaceae* during a Long-Term Outbreak. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2013; 57(10):5162–65.
49. Turano H, Gomes F, Medeiros M, Oliveira S, Fontes LC, Sato MIZ, Lincopan N. Presence of High-Risk Clones of OXA-23-Producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-Producing *Pseudomonas Aeruginosa* (ST277) in Environmental Water Samples in Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2016; 86 (1): 80–82.
50. Kim Y, Roh KH, Lee Y, Chung HS, Yum JH, Yong D, Lee K, Chong Y. Clonal Change of *bla_{SIM-1}*-Carrying *Acinetobacter spp.* from 2003 to 2008 in the Hospital Where It Was Initially Discovered. Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.). 2013; 19 (1): 37–41.
51. Sun F, Zhou D, Wang Q, Feng J, Feng W, Luo W, Zhang D, Liu Y, Qiu X, Yin Z, Chen W, Xia P. The First Report of Detecting the *BlaSIM-2* Gene and Determining the Complete Sequence of the SIM-Encoding Plasmid. Clinical Microbiology and Infection. 2016; 22 (4): 347–51.
52. Andrade LN, Woodford N, Costa Darini AL. International Gatherings and Potential for Global Dissemination of São Paulo Metallo- β -Lactamase (SPM) from Brazil. International Journal of Antimicrobial Agents. 2014; 43 (2): 196–97.

53. Siu LK, Liang PL, Chen JY, Lin FM, Chang SC. High-Level Expression of AmpC β -Lactamase Due to Insertion of Nucleotides between -10 and -35 Promoter Sequences in *Escherichia Coli* Clinical Isolates: Cases Not Responsive to Extended-Spectrum-Cephalosporin Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47 (7): 2138–44.
54. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Organisms. *Journal of Hospital Infection*. 2009; 73 (4): 345–54
55. Bradford PA. Extended Spectrum Betalactamase in the 21 Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistant Threat. *Clinical Microbiol Rev*. 2001; 14 (4): 933–51.
56. Paterson DL. Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Infection Control*. 2006; 34 (5 SUPPL.): 20–28.
57. Nijssen S, Florijn A, Bonten MJ, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Beta-Lactam Susceptibilities and Prevalence of ESBL-Producing Isolates among More than 5000 European *Enterobacteriaceae* Isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004; 24 (6): 585–91.
58. Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(1):115-21.
59. Yates C, Amyes S. Extended-Spectrum β -Lactamases in Non-Typhoidal *Salmonella spp.* isolated in the UK Are Now a Reality: Why the Late Arrival? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56 (2): 262–64.
60. Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella spp.* with Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins and Fluoroquinolones Isolated in North America and Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006; 54 (1): 13–21.
61. Carattoli, A. Animal Reservoirs for Extended Spectrum β -Lactamase Producers. *Clinical Microbiology and Infection* 14. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008; 117–23.
62. Seral García C, Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ. Betalactamasas de Espectro Extendido En Enterobacterias Distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010; 28 (SUPPL. 1): 12–18.
63. Bugarel M, Granier SA, Weill FX, Fach P, Brisabois A. A Multiplex Real-Time PCR Assay Targeting Virulence and Resistance Genes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *BMC Microbiology*. 2011; 11 (1): 151.
64. Frye JG, Fedorka-Cray PJ. Prevalence, Distribution and Characterization of Ceftiofur Resistance in *Salmonella enterica* Isolated from Animals in the USA from 1999 to 2003. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007; 30 (2): 134–42.
65. Frye JG, Fedorka-Cray PJ, Jackson CR, Rose M. Analysis of *Salmonella enterica* with Reduced Susceptibility to the Third-Generation Cephalosporin Ceftriaxone Isolated from U.S. Cattle During 2000–2004. *Microbial Drug Resistance*. 2008; 14 (4):251-58.
66. Glenn LM, Lindsey RL, Frank JF, Meinersmann RJ, Englen MD, Fedorka-Cray PJ, Frye JG. Analysis of Antimicrobial Resistance Genes Detected in Multidrug-Resistant

- Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated from Food Animals. Microbial Drug Resistance. 2011; 17 (3): 407–18.
67. Lindsey RL, Frye JG, Fedorka-Cray PJ, Meinersmann RJ. 2011. Microarray-Based Analysis of IncA/C Plasmid-Associated Genes from Multidrug-Resistant *Salmonella enterica*. Applied and Environmental Microbiology. 2011; 77 (19): 6991–99.
 68. Sjölund-Karlsson M, Howie RL, Blickenstaff K, Boerlin P, Ball T, Chalmers G, Duval B, Haro J, Rickert R, Zhao S, Fedorka-Cray PJ, Whichard JM. Occurrence of β -Lactamase Genes among Non-Typhi *Salmonella enterica* Isolated from Humans, Food Animals, and Retail Meats in the United States and Canada. Microbial Drug Resistance. 2013; 19(3):191–97.
 69. Clemente L, Manageiro V, Ferreira E, Jones-Días D, Correia I, Themudo P, Albuquerque T, Caniça M. Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamases among Isolates of *Salmonella enterica* subsp. enterica from Food-Producing Animals and Food Products, in Portugal. International Journal of Food Microbiology. 2013; 167 (2): 221–28.
 70. Figueiredo, Rui, Henriques A, Sereno R, Mendonça, da Silva GJ. Antimicrobial Resistance and Extended-Spectrum β -Lactamases of *Salmonella enterica* Serotypes Isolated from Livestock and Processed Food in Portugal: An Update. Foodborne Pathogens and Disease. 2015; 12 (2): 110–17.
 71. García-Fierro R, Montero I, Bances M, González-Hevia MA, Rodicio MR. Antimicrobial Drug Resistance and Molecular Typing of *Salmonella enterica* Serovar Rissen from Different Sources. Microbial Drug Resistance. 2016; 22 (3): 211–17.
 72. Lu Y, Zhao H, Sun J, Liu Y, Zhou X, Beier RC, Wu G, Hou X. Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovars Indiana and Enteritidis from Chickens in Eastern China. PLoS ONE. 2014; 9(5)
 73. Yang B, Wang Q, Cui S, Wang Y, Shi C, Xia X, Xi M, Wang X, Shi X, Wang D, Zhang Z, Meng J. Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Producing *Salmonella* Strains Isolated from Retail Foods in Shaanxi and Henan Province, China. Food Microbiology. 2014; 42:14–18.
 74. Wu H, Wang Y, Wu Y, Qiao J, Li H, Zheng S, Xia X, Cui S, Wang X, Xi M, Meng J, Yang B. Emergence of β -Lactamases and Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) Producing *Salmonella* in Retail Raw Chicken in China. Foodborne Pathogens and Disease. 2015; 12 (3): 228–34.
 75. Bae D, Cheng CM, Khan AA. Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing Non-Typhoidal *Salmonella* (NTS) from Imported Food Products. International Journal of Food Microbiology. 2015; 214. 12–17.
 76. Chon JW, Jung HI, Kuk M, Kim YJ, Seo KH, Kim SK. High Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Salmonella* in Broiler Carcasses from Poultry Slaughterhouses in South Korea. Foodborne Pathogens and Disease. 2015 12 (3): 190–96.
 77. Olarte J, Galindo E. *Salmonella typhi* resistant to chloramphenicol, ampicillin, and other antimicrobial agents: Strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. Antimicrob Agents Chemother. 1973; 4:597-601.
 78. Zaidi MB, León V, Canche C, Pérez C, Zhao S, Hubert SK, Abbott J, Blickenstaff K, McDermott PF. Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant blaCMY-2 *Salmonella* Typhimurium in Mexico. J Antimicrob Chemother. 2007; 60:398-401.
 79. Wiesner M, Zaidi MB, Calva E, Fernández-Mora M, Calva JJ, Silva C. Association of Virulence Plasmid and Antibiotic Resistance Determinants with Chromosomal Multilocus

- Genotypes in Mexican *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains. BMC Microbiology. 2009; 9: 1–15.
80. Ballesteros-Nayarit N, Rubio-Lozano MS, Delgado-Suárez E, Méndez-Medina D, Braña-Varela D, Rodas-Suárez O. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella spp.* aislados de carnes de res molida en la Ciudad de México. Salud Pública Méx. 2016; 58 (3): 113–18.
 81. Amábile-Cuevas CF. Antibiotic Resistance in Mexico: A Brief Overview of the Current Status and Its Causes. J Infect Dev Ctries. 2010; 4 (3): 126–31.
 82. Silva-Sánchez J, Aguilar-Zacarías C. Beta-lactamase bioassay: A simplified method to determine extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in enterobacteria. Arch Med Res. 1997; 28:285-7.
 83. Silva J, Aguilar C, Estrada MA, Echaniz G, Carnalla N, Soto A, López-Antuñano FJ. Susceptibility to new beta-lactams of enterobacterial extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in México. J Chemother. 1998; 10:102-7.
 84. Silva J, Aguilar C, Becerra Z, López-Antuñano F, García R. Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of enterobacteria in México. Microb Drug Resist. 1999; 5:189-93.
 85. Silva-Sánchez J, Garza-Ramos JU, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Rojas-Moreno T, Andrade-Almaraz V. Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae causing nosocomial infections in Mexico. A retrospective and multicenter study. Arch Med Res. 2011; 42:156-62.
 86. Garza-González E, Mendoza-Ibarra SI, Llaca-Díaz JM, González GM. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. J Med Microbiol. 2011; 60:84-90.
 87. Zaidi MB, Estrada-García T, Campos FD, Chim R, Arjona F, Leon M, Michell A, Chaussabel D. Incidence, Clinical Presentation, and Antimicrobial Resistance Trends in *Salmonella* and *Shigella* Infections from Children in Yucatan, Mexico. Frontiers in Microbiology. 2013; 4:1–10.
 88. Regalado-Pineda ID. Aislamiento y caracterización de cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán. [Tesis]. Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2011. 68 p.
 89. Inocencio-Velázquez AG. Resistencia a antibióticos y presencia de integrones en aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y lácteos en el estado de Michoacán. [Tesis]. Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2011. 27 p.
 90. Vázquez-Narváez EG. Elementos Repetitivos para el análisis de Diversidad Genética de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de productos cárnicos y lácteos del Estado de Michoacán. [Tesis]. Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2012. 72 p.
 91. Inocencio-Velázquez AG. Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán. [Tesis]. Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2013. 68 p.
 92. Maldonado-Ruíz. Perfiles de virulencia de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos

- de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán. [Tesis]. Michoacán: Universidad Michoacana de Sn Nicolás de Hidalgo; 2015. 66 p.
93. Hernández Villaseñor C. Elementos genéticos asociados a la resistencia a antibióticos en cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos del estado de Michoacán. [Tesis]. Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2015. 53 p.
 94. Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, Helmuth R, Hauser E, Guerra B, Beutlich J, Brisabois A, Peters T, Svensson L, Madajczak G, Litrup E, Imre A, Herrera-Leon S, Mevius D, Newell DG, Malorny B. Virulotyping and Antimicrobial Resistance Typing of *Salmonella enterica* Serovars Relevant to Human Health in Europe. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2010; 7 (5): 523–35.
 95. Lalzampaia H, Dutta TK, Warjri I, Chandra R. PCR-Based Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases (*bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{TEM}) in *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Pigs in North Eastern India (Mizoram). *Indian Journal of Microbiology*. 2013; 53 (3): 291–96.
 96. Bueno Sancho J. Epidemiología Molecular De Carbapenemasas. [Trabajo Final de Master]. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2015. 93 p.
 97. Green M, Sambrook J. Molecular cloning. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

ANEXO A

Datos obtenidos para cada uno de los genes *bla*

Gen <i>bla</i>_{TEM}				Total: 8 cepas	
Serotipo o Serogrupo	No. Cepas	Municipio	No. Cepas	Alimento	No. Cepas
Anatum	1	Churintzio	1	Cerdo	1
No hay dato	1	Lázaro Cárdenas	3	Chorizo	2
Panama	5	Morelia	1	Jamón	1
Serogrupo B	1	Tuxpan	1	Res	4
		Zamora	2		
Año	No. Cepas	Resistencia		No. Cepas	
2009	1	β-lactámicos		2	
2010	2	β-lactámicos + Otros		4	
2011	6	Otros		2	
Gen <i>bla</i>_{GIM}			Total: 22 cepas		
Serotipo o Serogrupo	No. Cepas	Serotipo o Serogrupo	No. Cepas		
Adelaide	1	Infantis	1		
Agona	3	Javiana	1		
Albany	2	London	1		
Anatum	2	Meleagridis	1		
Bovismorbificans	1	Muenchen	1		
Derby	1	Panama	2		
Enteritidis	1	Senftenberg	1		
Heidelberg	2	Serogrupo C1	1		
Municipio	No. Cepas	Alimento	No. Cepas		
Apatzingán	5	Bovino	3		
Lázaro Cárdenas	7	Cerdo	1		
Morelia	3	Chorizo	5		
Parácuaro	1	Longaniza	1		
Pátzcuaro	1	Otros	2		
Uruapan	2	Pollo	5		
Zamora	1	Queso	2		
Zitácuaro	2	Res	3		
Resistencia	No. Cepas	Año	No. Cepas		
β-lactámicos	1	2010	3		
β-lactámicos + Otros	3	2011	4		
Otros	11	2013	15		
Sin Registro	7				
Gen <i>bla</i>_{SIM}			Total: 43 cepas		
Serotipo o Serogrupo	No. Cepas	Serotipo o Serogrupo	No. Cepas		
Agona	2	Montevideo	1		
Albany	2	Muenchen	1		
Anatum	2	Newport	1		

Braenderup	1	No hay dato	2
Bredency	1	Oranienburg	1
Derby	1	Panama	1
Enteritidis	4	Saintpaul	1
Havana	1	Schwarzengrund	2
Heidelberg	2	Senftenberg	4
Infantis	1	Serogrupo C1	2
Javiana	1	Tennessee	1
Kentucky	1	Typhimurium	5
Kiambu	1	Weltevreden	1
Municipio	No. Cepas	Municipio	No. Cepas
Álvaro Obregón	2	Morelia	6
Apatzingán	1	Pátzcuaro	5
Hidalgo	1	Tacámbaro	1
Huetamo	2	Uruapan	1
Jacona	3	Zacapu	2
La Piedad	2	Zamora	4
Lázaro Cárdenas	9	Zitácuaro	4
Alimento	No. Cepas	Resistencia	No. Cepas
Bovino	7	β-lactámicos	3
Cerdo	2	β-lactámicos	13
Chorizo	3	Otros	9
Longaniza	1	Sensibles	5
Otros	6	Sin Registro	13
Pollo	16	Año	No. Cepas
Res	8	2009	1
		2013	42

Gen <i>bla</i>_{SPM}		Total: 47 cepas	
Serotipo o Serogrupo	No. Cepas	Serotipo o Serogrupo	No. Cepas
Adelaide	1	Reading	1
Agona	3	Salmonella I	1
Albany	1	Sandiego	1
Anatum	7	Senftenberg	3
Derby	1	Serogrupo B	3
Havana	2	Serogrupo C1	2
Infantis	2	Serogrupo D monofásica	1
Kentucky	1	Serogrupo E4	2
Montevideo	1	Sinstorf	2
Muenchen	2	Typhimurium	5
Newport	1	Vejle	1
No hay dato	1	Weltevreden	1
Poona	1		
Municipio	No. Cepas	Municipio	No. Cepas
Angangueo	1	Múgica	1
Apatzingán	3	Pátzcuaro	1

Desconocido	2	Tacámbaro	1
Huetamo	6	Tuzantla	1
Jacona	1	Uruapan	5
Lázaro Cárdenas	13	Yurécuaro	2
Morelia	8	Zamora	2
Alimento	No. Cepas	Alimento	No. Cepas
Bovino	2	Pollo	2
Cerdo	2	Queso	6
Chorizo	16	Res	16
Longaniza	2	Sin Dato	1
Resistencia	No. Cepas	Año	No. Cepas
β-lactámicos	3	2008	11
β-lactámicos + Otros	10	2009	12
Otros	20	2010	10
Sensibles	10	2011	9
Sin Registro	4	2013	3
		Sin fecha	2

Gen <i>bla</i>_{TEM+SPM}		Total: 2 cepas	
Serotipo o Serogrupo	No. Cepas	Municipio	No. Cepas
Anatum	1	José Sixto Verduzco	1
Serogrupo C2 monofásica	1	Uruapan	1
Alimento	No. Cepas	Año	No. Cepas
Chorizo	2	2010	1
		2011	1
Resistencia	No. Cepas		
β-lactámicos + Otros	1		
Sensibles	1		

Gen <i>bla</i>_{GIM+SPM}		Total: 8 cepas	
Serotipo o Serogrupo	No. Cepas	Serotipo o Serogrupo	No. Cepas
Agona	1	Serogrupo C1	1
Enteritidis	1	Serogrupo E1	1
Montevideo	1	Serogrupo E4	1
Serogrupo B	1	Typhimurium	1
Municipio	No. Cepas	Municipio	No. Cepas
Huetamo	1	Múgica	1
Lázaro Cárdenas	2	Pátzcuaro	2
Morelia	1	Uruapan	1
Alimento	No. Cepas	Año	No. Cepas
Chorizo	1	2010	3
Pollo	3	2011	2
Res	4	2013	3
Resistencia	No. Cepas		
β-lactámicos + Otros	1		
Otros	6		
Sensibles	1		

Gen <i>bla</i>_{SIM+SPM}		Total: 4 cepas	
Serotipo o Serogrupo	No. Cepas	Municipio	No. Cepas
Anatum	2	Morelia	1
Newport	1	Pátzcuaro	1
Typhimurium	1	Uruapan	2
Alimento	No. Cepas	Resistencia	No. Cepas
Bovino	2	β -lactámicos	1
Chocolate	1	β -lactámicos + Otros	2
Chorizo	1	Sin registro	1
Año		2013	
Gen <i>bla</i>_{GIM+SIM+SPM}		Total: 6 cepas	
Serotipo o Serogrupo	No. Cepas	Serotipo o Serogrupo	No. Cepas
Agona	1	Heidelberg	1
Anatum	1	Montevideo	1
Derby	1	Serogrupo B	1
Municipio	No. Cepas	Alimento	No. Cepas
Apatzingán	2	Chorizo	1
Lázaro Cárdenas	1	Pollo	2
Morelia	1	Queso	1
Pátzcuaro	1	Res	1
Uruapan	1	Tilapia	1
Resistencia	No. Cepas	Año	No. Cepas
β -lactámicos + Otros	1	2013	6
Otros	1		
Sensibles	4		