



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Análisis de similitud genética y resistencia a los antibióticos β -lactámicos y colistina en serotipos del género *Salmonella* procedentes de granjas de pollos de engorde en Galápagos, Ecuador.

Trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación para la obtención del título de Magíster en Producción y Sanidad Avícola

AUTOR: Diego Martín Cushicóndor Collaguazo, MVZ

TUTOR: Carlos Alfonso Molina Hidalgo, Ph.D.

QUITO, 2017

© DERECHOS DEL AUTOR

Yo, DIEGO MARTÍN CUSHICÓNDOR COLLAGUAZO, en calidad de autor del trabajo de titulación, “ANÁLISIS DE SIMILITUD GENÉTICA Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS Y COLISTINA EN SEROTIPOS DEL GÉNERO *Salmonella* PROCEDENTES DE GRANJAS DE POLLOS DE ENGORDE EN GALÁPAGOS, ECUADOR.”, autorizo a la Universidad Central del Ecuador hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Así mismo autorizo a la Universidad Central del Ecuador para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

En la ciudad de Quito, a los 14 días del mes de diciembre de 2017.



Diego Martín Cushicóndor Collaguazo

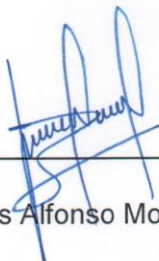
C.C. 172174695-4

cdmcushicondor@outlook.com

APROBACIÓN DEL TUTOR

Yo, CARLOS ALFONSO MOLINA HIDALGO en calidad de tutor del trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación, para la obtención del Título de Magíster en Producción y Sanidad Avícola, elaborado por el estudiante DIEGO MARTÍN CUSHICÓNDOR COLLAGUAZO del programa de posgrado Maestría en Producción y Sanidad Avícola, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del jurado examinador que se asigne, por lo que APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación determinado por la Universidad Central del Ecuador.

En la ciudad de Quito, a los 14 días del mes de diciembre de 2017.



Carlos Alfonso Molina Hidalgo, Ph.D.

DOCENTE-TUTOR

C.C. 171531633-5

DEDICATORIA

A Dios

A mi familia

Diego Cushicóndor

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Christian Vinuesa B., Ph.D., Director de la Unidad de Investigación en Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, por permitirme ser parte del proyecto “Bacterias transmitidas por alimentos en granjas avícolas en las Islas Galápagos”, que se encuentra dentro del “Convenio Marco Interinstitucional entre la Universidad Central del Ecuador y la Agencia de Regulación y Control de Bioseguridad de Galápagos - Ministerio del Ambiente”

Cristian Narváez, MVZ, Técnico en UNIETAR, por su colaboración en la parte de laboratorio.

María Inés Baquero, MSc. y Carlos Gómez, MVZ, personal del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, por colaborar en la parte de laboratorio.

Fabricio Vásquez de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos “ABG”, por el apoyo en el envío de las muestras.

Alfonso Molina H., Ph.D. por sus constructivos comentarios al proyecto de investigación.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Análisis de similitud genética y resistencia a los antibióticos β -lactámicos y colistina en serotipos del género *Salmonella* procedentes de granjas de pollos de engorde en Galápagos, Ecuador.

El tribunal constituido por:

María Inés Baquero, Presidente; Richar Rodríguez, Vocal Principal; Christian Albuja, Vocal Suplente y Alfonso Molina, Tutor.

Luego de receptor el Trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación para la obtención del Título de Magíster en Producción y Sanidad Avícola, presentado por el Sr. Diego Cushicóndor C., MVZ con el título de "Análisis de similitud genética y resistencia a los antibióticos β -lactámicos y colistina en serotipos del género *Salmonella* procedentes de granjas de pollos de engorde en Galápagos, Ecuador".

Ha emitido el siguiente veredicto: APROBADO

En la ciudad de Quito, a los catorce días del mes de diciembre de 2017.

Para constancia de lo actuado firman:

Dra. María Inés Baquero	Presidente
Dr. Richar Rodríguez	Vocal Principal
Dr. Christian Albuja	Vocal Suplente
Dr. Alfonso Molina	Tutor

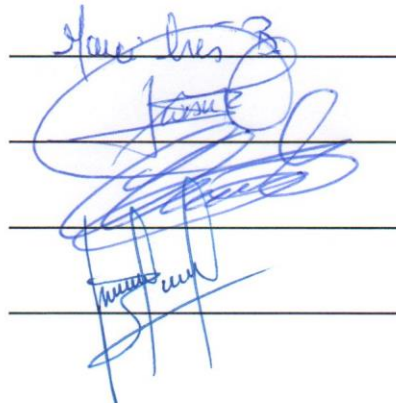


TABLA DE CONTENIDO

	pág.
© DERECHOS DEL AUTOR	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
GLOSARIO.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	3
GENERAL.....	3
ESPECÍFICOS.....	3
1 MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Antecedentes	4
1.2 Historia, taxonomía y nomenclatura del género <i>Salmonella</i>	5
1.3 Características generales.....	6
1.4 Epidemiología	7
1.5 Aspectos de Salud Pública	9
1.6 Diagnóstico de laboratorio	10
1.7 Agentes antimicrobianos	12
1.8 Resistencia a los antimicrobianos.....	12
1.9 Pruebas de resistencia antimicrobiana	17
2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	19
2.4 Descripción de la zona de estudio.....	19
2.5 Diseño del estudio.....	19

2.6	Procedimiento de laboratorio.....	19
2.4	Técnicas de procesamiento y análisis de datos	23
3	RESULTADOS.....	24
3.4	Serotipos del género <i>Salmonella</i>	24
3.5	Resistencia antimicrobiana.....	24
3.6	PFGE.....	27
4	DISCUSIÓN.....	28
5.	CONCLUSIONES.....	34
6.	RECOMENDACIONES.....	35
	BIBLIOGRAFÍA.....	36
	ANEXOS.....	61

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Posición taxonómica y nomenclatura del género <i>Salmonella</i> (Grimont & Weill. 2007; Issenhuth-Jeanjean et al. 2014)	6
Tabla 2. Tasa de serotipos de <i>Salmonella</i> identificadas a partir de 7 cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas de 22 granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz, Galápagos	24
Tabla 3. Tasas de resistencia a los antibióticos probados para los serotipos de <i>S. Infantis</i> (n =5).....	24
Tabla 4. Tasa de genes del grupo <i>bla</i> TEM-1 y <i>bla</i> CTX-M-9 en serotipos de <i>S. Infantis</i> con patrón de resistencia AFT (n = 4).....	26
Tabla 5. Variantes de genes β -lactamasa en serotipos de <i>S. Infantis</i> con genes del grupo <i>bla</i> CTX-M-9 (n = 4) y <i>bla</i> TEM-1 (n = 3).....	26
Tabla 6. Tasa de genotipos presentes en cada serotipo de <i>Salmonella</i> con similitud genética intraserotipo y entre serotipos.....	27

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Amplificación por PCR de genes <i>bla</i> CTX-9 en 4 aislados de <i>S. Infantis</i>	25
Figura 2. Amplificación por PCR de genes <i>bla</i> TEM-1 en 3 aislados de <i>S. Infantis</i>	25
Figura 3. Dendograma de los patrones de bandas generados por PFGE de 7 serotipos de <i>Salmonella</i>	27

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Registro de muestreo – <i>Salmonella</i>	62
ANEXO B. Diagrama para procedimiento de la investigación	64
ANEXO C. Método de aislamiento para <i>Salmonella</i> spp. móviles en contenido cecal	65
ANEXO D. Método de serotipificación para <i>Salmonella</i>	68
ANEXO E. Método de microdilución en caldo para <i>Salmonella</i> spp.....	74
ANEXO F. Método de PCR simple para detectar genes β -lactamasa	77
ANEXO G. Tabla para registro de aislamiento y pruebas bioquímicas para identificación de <i>Salmonella</i> spp.....	87
ANEXO H. Tablas de registro de serotipificación somática y flagelar de aislados de <i>Salmonella</i> spp.	88
ANEXO J. Tablas de registro de la concentración mínima inhibitoria de serotipos de <i>Salmonella</i> para determinar resistencia.....	89
ANEXO K. Tablas de registro de cuantificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y genes de resistencia en serotipos de <i>Salmonella</i>	90
ANEXO L. Dendograma de patrones de PFGE de serotipos de <i>Salmonella</i>	91
ANEXO M. Resultados de identificación y resistencia a los antibióticos en <i>Salmonella</i>	92
ANEXO N. Lista de abreviaciones.....	93
ANEXO P. Traducción del resumen.....	95

GLOSARIO

AISLADO RESISTENTE A LOS ANTIMICROBIANOS: cuando su valor de concentración mínima inhibitoria (MIC) (en mg/l) está por encima del valor de corte o el diámetro de difusión del disco (en mm) está por debajo del valor de corte (EFSA & ECDC, 2017).

ANTIBIÓTICO: agente o sustancia que se produce a partir de microorganismos que pueden actuar contra otro microorganismo vivo. Las sustancias antimicrobianas que son sintéticas, semi-sintéticas, derivadas de plantas o animales, por definición estricta, no se consideran antibióticos. Aunque, no es técnicamente correcto, el uso del término "antibiótico" es interpretado como "antimicrobiano" (WHO, 2017).

ANTIMICROBIANO: agente o sustancia derivada de cualquier fuente (microorganismos, plantas, animales, sintéticos o semisintéticos) que actúa contra cualquier tipo de microorganismo: bacterias (antibacterianas), micobacterias (antimicobacterianas), hongos (antifúngicos), parásitos (antiparasitarios) y virus (antivirales). Todos los antibióticos son antimicrobianos, pero no todos los antimicrobianos son antibióticos (WHO, 2017).

ANTIMICROBIANOS DE IMPORTANCIA CRÍTICA (CIA): clases antimicrobianas usadas en seres humanos que cumplen tanto el criterio C1 como C2 se denominan de importancia crítica para la medicina humana. Criterio 1 (C1): esta clase antimicrobiana es la única, o una de las limitadas terapias disponibles, para tratar infecciones bacterianas graves en humanos. Criterio 2 (C2): esta clase antimicrobiana se usa para tratar infecciones en humanos causadas por: a) bacterias que pueden ser transmitidas a seres humanos a partir de fuentes no humanas, o b) bacterias que pueden adquirir genes de resistencia de fuentes no humanas (WHO, 2017).

AVES DE CORRAL: aves criadas o mantenidas en cautiverio para la producción de carne y huevos destinados al consumo, la elaboración de otros productos comerciales, o la reproducción de los mismos (Nogales & Andrade, 2013).

ENFERMEDAD TRANSMITIDA POR LOS ALIMENTOS (ETA): enfermedad comúnmente transmitida a través de alimentos ingeridos. Las ETAs comprenden un amplio grupo de enfermedades, y puede ser causada por patógenos microbianos, parásitos, contaminantes químicos y biotoxinas (WHO, 2015).

GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS: genes de microorganismos que confieren resistencia a antimicrobianos. A menudo se encuentran en elementos genéticos móviles como plásmidos, lo que permite la transmisión horizontal de resistencia, de cepas resistentes a cepas susceptibles (FAO, WHO, & OIE, 2011).

GENES MCR: genes que codifican enzimas de la familia fosfoetanolamina transferasa para hidrolizar y conferir resistencia a colistina, que es una polimixina. Estos genes están en plásmidos y, por tanto, son móviles, de modo que pueden transferirse fácilmente entre bacterias (WHO, 2017).

KPC: enzimas carbapenemasas de clase A más prevalentes a nivel global que hidrolizan eficientemente las penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenems y son parcialmente inhibidas por inhibidores de β -lactamasa tales como ácido clavulánico y tazobactam (Escandón-Vargas, Reyes, Gutiérrez, & Villegas, 2017).

NIVEL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: porcentaje de aislamientos resistentes entre los aislados evaluados en términos de: rara, <0,1%; muy baja, 0,1% a 1,0%; baja, > 1,0% a 10,0%; moderada, > 10,0% a 20,0%; alta, > 20,0% a 50,0%; muy alta, > 50,0% a 70,0% y extremadamente alta, > 70,0% (EFSA & ECDC, 2017).

OXIMINO- β -LACTAMS: β -lactamasas con una cadena oximinósido diseñada para bloquear la acción de la β -lactamasa. Algunas veces denominadas "cefalosporinas de tercera generación", incluyen cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefepime (un derivado de "cuarta generación") (Jacoby & Munoz-Prince, 2005).

RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS (MDR): falta de susceptibilidad a al menos un agente en tres o más categorías antimicrobianos (Exner et al., 2017).

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: capacidad de un microorganismo para sobrevivir a una concentración dada de un agente antimicrobiano en el que la población normal del microorganismo moriría, esto también es conocido como "punto de interrupción epidemiológico" (WHO, 2017).

SEROTIPO: subdivisión de una especie o subespecie distinguible de otras cepas en función de un carácter antigénico (FAO et al., 2011).

β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (ESBL): enzimas capaces de hidrolizar oximinocefalosporinas, pero son inhibidas por el ácido clavulánico y no son activas contra las cefamicinas, derivan principalmente de TEM y CTX-M como resultado de cambios o sustituciones de aminoácidos (Jacoby & Munoz-Prince, 2005).

Análisis de similitud genética y resistencia a los antibióticos β -lactámicos y colistina en serotipos del género *Salmonella* procedentes de granjas de pollos de engorde en Galápagos, Ecuador.

Autor: Diego Martín Cushicóndor Collaguazo

Tutor: Carlos Alfonso Molina Hidalgo

RESUMEN

La difusión de serotipos de *Salmonella* resistente a los antibióticos es un problema emergente a nivel global. Por lo cual, el objetivo principal de este estudio fue analizar la resistencia a los antibióticos β -lactámicos y colistina en serotipos de *Salmonella* aislados del contenido cecal de pollos de engorde procedentes de granjas de la Isla Santa Cruz, Galápagos. Se analizaron 22 muestras para serotipificación de *Salmonella* según la norma ISO 6579/Amd1. EL serotipo más predominante fue *S. Infantis* con 71,4% (5/7) seguido por *S. Schwarzengrund* y *S. Mbandaka* con 14,3% (1/7) cada uno. Utilizando placas de sensibilidad EUVSEC, el 80% (4/5) de *S. Infantis* presentó un fenotipo resistente a ampicilina, cefotaxima y ceftazidima (AFT). Con una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final se detectó genes del grupo *bla*CTX-M-9 y *bla*TEM-1 en el 80% (4/5) y 60% (3/5) respectivamente. La secuenciación de amplicones de PCR confirmó genes *bla*CTX-M-65 (n = 4), *bla*TEM-1A (n = 2) y *bla*TEM-136 (n = 1). Los resultados de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) revelaron 5 genotipos en los 3 serotipos de *Salmonella* y 3 genotipos pertenecientes a *S. Infantis* mostraron una similitud del 85,7%. En conclusión, este estudio demuestra la presencia de 3 serotipos de *Salmonella*, con una propagación clonal de *S. Infantis*, capaz de codificar enzimas β -lactamasa de espectro extendido (ESBL), en granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz. Este serotipo podría comprometer el uso clínico de antibióticos β -lactámicos de espectro extendido en infecciones graves.

PALABRAS CLAVES: β -LACTÁMICOS / COLISTINA / ESBL / GALÁPAGOS / POLLOS DE ENGORDE

Analysis of genetic similitude and resistance to β -lactamic antibiotic and colistin in serotypes of *Salmonella* gender, derived from broiler farms in Galápagos, Ecuador.

Author: Diego Martín Cushicóndor Collaguazo

Tutor: Carlos Alfonso Molina Hidalgo

ABSTRACT

Dissemination of antibiotic-resistant *Salmonella* serotypes in an emergent trouble worldwide. The main purpose of the current study was analyzing resistance to β -lactamic antibiotic and colistin in *Salmonella* serotypes isolated from the cecal content of fattening chicken from broiler farms located in Santa Cruz Island, Galápagos. Twenty two samples were taken for serotyping of *Salmonella* pursuant to ISO 6579/Amd1 standard. The most prevailing serotype was *S. Infantis* with 71.4% (5/7) followed by *S. Schwarzengrund* and *S. Mbandaka* with 14.3% (1/7), respectively. By using EUVSEC plates, 80% (4/5) of *S. Infantis* showed a phenotype resistant to ampicillin, cefotaxime and ceftazidime (AFT). With a final point polymerase chain reaction (PCR) test, gens of the *bla*CTX-M-9 and *bla*TEM group were found, with 80% (4/5) and 60% (3/5) respectively. Sequencing of PCR amplicons confirmed the existence of *bla*CTX-M-65 (n = 4), *bla*TEM-1A (n = 2) and *bla*TEM-136 (n = 1) gens. Results of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) revealed 5 genotypes in 3 *Salmonella* serotypes 3 genotypes of *S. Infantis* showed a similitude of 85.7%. The current study showed the existence of 3 *Salmonella* serotypes, with a clonal dissemination of *S. Infantis*, capable to encode enzymes extended spectrum β -lactamase (ESBL), in broiler farm located in Santa Cruz Island. Such serotype could compromise the clinical use of extended spectrum β -lactamic antibiotic in serious infections.

KEYWORDS: β -LACTAMIC / BROILER / COLISTIN / ESBL / GALÁPAGOS

INTRODUCCIÓN

La *Salmonella* no tifoidea (NTS, por sus siglas en inglés) con un alto potencial zoonótico, transmitido principalmente a través de alimentos, es un problema frecuente para la salud pública a nivel mundial con impacto económico y social (Djeffal et al., 2017; Nyabundi et al., 2017). El género *Salmonella* cuenta con aproximadamente 2659 serotipos, 1586 pertenecen a la subespecie entérica y de 10 a 20 causan enfermedades zoonóticas (Hafez & Hauck, 2015; Issenhuth-Jeanjean et al., 2014). Las aves de corral y sus productos han sido consideradas principales reservorios de NTS (Foley, Lynne, & Nayak, 2008; Moraes et al., 2016; Nógrády, Király, Davies, & Nagy, 2012; Pires, Vieira, Hald, & Cole, 2014).

Un problema mayor para la salud pública es el surgimiento de serotipos de *Salmonella* resistentes a los antibióticos que han hecho que fármacos terapéuticamente eficaces no estén disponibles para su uso; además, el establecimiento y diseminación ha sido favorecido por mecanismos de resistencia antimicrobiana fácilmente transferibles (Chuma et al., 2013; Nguyen et al., 2016; Shahada et al., 2010), y el uso inadecuado de antimicrobianos en la medicina humana y veterinaria (Arlet et al., 2006; Lai et al., 2014; Voss-Rech et al., 2015), viajes internacionales, comercio intercontinental, falta de recursos financieros y/o inadecuadas decisiones políticas (Bonelli, Moreira, & Picão, 2014). Las aves de corral aparentemente sanas son consideradas reservorios de *Salmonella* que codifican enzimas β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), las cuales pueden transmitirse a los seres humanos, principalmente, a través de sus productos (Chuma et al., 2013; Cloeckaert et al., 2007; Djeffal et al., 2017; Franco et al., 2015; Noda, Murakami, Etoh, Okamoto, & Yatsuyanagi, 2015; Shahada et al., 2010).

Epidemiológicamente es importante conocer qué serotipos se encuentran circulantes, así como la introducción de nuevos serotipos de importancia para la salud pública, los animales de producción y el ambiente, para beneficio de las poblaciones y confianza de los turistas para visitar los diferentes lugares (Flockhart et al., 2016; Guerra, de Almeida, & Willingham, 2016). La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es la prueba de referencia que proporciona evidencia de relación genética molecular de dos o más cepas emergentes y alta concordancia epidemiológica para localizar brotes bacterianos de origen alimentario (Jordan & Walker, 2015; Miller et al., 2014; Trujillo, Keys, & Brown, 2011; Yang et al., 2013).

En el Reino Unido, desde el 2007, se ha llevado a cabo programas para controlar *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Infantis y *Salmonella* Virchow en aves de corral (DEFRA, 2008), ya que han ido incrementando en importancia relativa a nivel mundial en comparación con *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium (Hendriksen et al., 2011). En especial, *S. Infantis* resistente a los antibióticos ha tenido una propagación internacional en parvadas de pollos de engorde (Nógrády et al., 2012).

En Ecuador, los esfuerzos han estado enfocados en controlar *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en aves de corral debido a problemas para la salud pública (AGROCALIDAD & MAGAP, 2010). Sin embargo, *S. Infantis* ha sido el serovar más común aislado en parvadas de pollo de engorde (Villagómez-Estrada, Logacho-Pilataxi, & Vinueza-Burgos, 2017; Vinueza-Burgos, Cevallos, Ron-Garrido, Bertrand, & De Zutter, 2016) con alto grado de resistencia a los antibióticos β -lactámicos por albergar genes del grupo beta-lactamasa CTX-M (*bla*CTX-M) (Vinueza-Burgos et al., 2016). Para entender mejor la epidemiología de *Salmonella* productora de ESBL es necesario conocer variantes de genes presentes en estos patógenos (Álvarez-Fernández, Alonso-Calleja, García-Fernández, & Capita, 2012; Chuma et al., 2013; Kameyama et al., 2012; Noda et al., 2015). Asimismo, se requiere de una vigilancia epidemiológica de otros genes de resistencia como *bla*TEM (Shahada et al., 2010), *bla*SHV (Chiaretto et al., 2008), *bla*CMY-2 (Chuma et al., 2013), *bla*KPC (Madec, Haenni, Nordmann, & Poirel, 2017) y MCR (Webb et al., 2016), ya que son parte de los genes que codifican resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica (NOAH, 2016; WHO, 2017).

En las granjas de pollos de engorde en el Archipiélago de Galápagos se desconoce la presencia de *Salmonella* spp. (Deem, Cruz, Higashiguchi, & Parker, 2012; Soos et al., 2008). La distribución de serotipos de *Salmonella* en aves de corral es geográficamente variable y cambian a través del tiempo (Gast, 2007); por lo que, parvadas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz podrían ser un reservorio y un medio importante de transmisión de serotipos de *Salmonella*, incluidas cepas MDR (Barbour et al., 2015; Mead et al., 2010; Trung et al., 2016; Voss-Rech et al., 2015; Yamatogi et al., 2016; Ziech et al., 2016). Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue analizar la resistencia a los antibióticos β -lactámicos y colistina en serotipos de *Salmonella* aislados del contenido cecal de pollos de engorde procedentes de 22 granjas de la Isla Santa Cruz, cantón de la provincia de Galápagos.

La información obtenida en este estudio podría facilitar a la industria avícola de Galápagos el desarrollo y aplicación de estrategias de intervención para reducir los niveles de contaminación por *Salmonella* spp. en el producto terminado, así como estrategias que eviten el aumento y propagación de serotipos de *Salmonella* resistente

a los antimicrobianos. Sin embargo, la salmonelosis requiere un enfoque de “Una Sola Salud” con una vigilancia sistemática en todos los niveles (seres humanos y especies de animales tanto de producción como de fauna endémica) para dar medidas eficaces de control y preservar la eficacia de los antimicrobianos (Kahn, 2006; McDermott et al., 2016), ya que es un problema importante que va en aumento a nivel global (Hassan, Salam, & Abdel-Latef, 2016).

OBJETIVOS

GENERAL

Analizar la resistencia a los antibióticos β -lactámicos y colistina en serotipos de *Salmonella* aislados del contenido cecal de pollos de engorde procedentes de granjas avícolas de Santa Cruz, cantón de la provincia de Galápagos, Ecuador.

ESPECÍFICOS

Aislar e identificar serotipos de *Salmonella* por pruebas bioquímicas y serológicas a partir del contenido cecal de pollos de engorde según la norma ISO 6579/Amd1.

Determinar fenotípica y genotípicamente β -lactamasas y fosfoetanolamina transferasas en serotipos de *Salmonella* mediante pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y secuenciación de genes de resistencia antimicrobiana.

Caracterizar la similitud genética en serotipos de *Salmonella* provenientes del contenido cecal de pollos de engorde mediante prueba de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

En un estudio realizado por Vinuesa-Burgos et al. (2016), titulado “Prevalencia y diversidad de serotipos de *Salmonella* en pollos de engorde de Ecuador en edad de sacrificio” investigaron la prevalencia, los genotipos y la resistencia antimicrobiana de los serotipos de *Salmonella* en pollos de engorde en Ecuador”. Se utilizó el contenido cecal de 388 lotes de pollos de engorde que procedieron de 119 granjas y, se analizó mediante el protocolo ISO 6579/Amd1 para determinar prevalencia de *Salmonella* spp. Se realizó serotipificación y electroforesis en gel de campo pulsado. Se determinó resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípicamente. El estudio reportó una prevalencia de *Salmonella* spp. a nivel de granja de 42% (50/119). Se encontró *S. Infantis* (83,9%; 52/62), *S. Enteritidis* (14,5%; 9/62) y *S. Corvalis* (1,6%; 1/62). *S. Infantis* fue el serotipo con mayor número de genotipos (12) seguido de *S. Enteritidis* (2) y *Salmonella* *Corvalis* (1). *S. Infantis* presentó resistencia de 57,7% (Kanamicina) a 98,1% (ácido nalidíxico y sulfametoxazol). La presencia del gen *bla*CTX-M se observó en el 63,5% (33/52) de *S. Infantis*. En conclusión el estudio proporcionó información de prevalencia y multiresistencia en *Salmonella* aisladas de aves comerciales en Ecuador.

En otro estudio llevado a cabo por Villagómez-Estrada et al. (2017), titulado “Presencia y resistencia antimicrobiana de serovares de *Salmonella enterica* aislados en una empresa avícola integrada en Ecuador” investigaron serotipos y patrones de resistencia antimicrobiana en *Salmonella* spp. aislada en una empresa avícola integrada en Ecuador. Se recolectaron 289 muestras y aislaron por el protocolo ISO 6579:2002. La susceptibilidad a los antibióticos se analizó con el método de difusión en disco con 13 agentes antibióticos. Se reportó una prevalencia a nivel de crianza en granja de 25,55% (12/47). Los serotipos identificados fueron *S. Infantis* (86,2%, 50/58), *Salmonella* *Liverpool* (6,9%, 4/58), *Salmonella* *Amsterdam* (1,7%, 1/58) y *Salmonella* *Uganda* (1,7%, 1/58). Los aislados de *Salmonella* spp. tuvieron resistencia a nitrofurantoína (94,8%), tetraciclina (82,8%), trimetoprima-sulfametoxazol (81%) y cloranfenicol (79,3%). En conclusión, el estudio encontró que *Salmonella* spp. resistente a los antibióticos puede estar presente en cualquier etapa del proceso de producción de aves.

En el estudio ejecutado por Sánchez-Chugchilán (2017), titulado “Identificación molecular de *Salmonella* spp., en un sistema integrado de producción de pollos de engorde” se investigó la relación genética de cepas de *Salmonella* spp., en un sistema integrado de producción de pollos de engorde mediante la técnica PFGE. Se analizó un total de 299 muestra provenientes de 4 granjas. Se aislaron 60 cepas de *Salmonella* spp.. El análisis de PFGE constató la presencia de 8 genotipos. Los aislados de *Salmonella* identificados como *S. Infantis* estuvieron agrupados en 3 genotipos estrechamente relacionados, mientras tanto, los aislados de *Salmonella* sin serotipo identificado generaron 5 genotipos. En conclusión, el estudio demostró que hay un serotipo predominante con estrecha relación genética.

1.2 Historia, taxonomía y nomenclatura del género *Salmonella*

El microorganismo fue aislado por primera vez en 1884, por el Veterinario estadounidense Daniel Elmer Salmon, en un cerdo con cólera e identificado posteriormente por Theobald Smith (Cosby et al., 2015). El agente patógeno originalmente fue llamado "*Bacillus choleraesuis*", y posteriormente nombrado "*Salmonella choleraesuis*" por el francés Lignieres en 1900 (Su & Chiu, 2006). La resistencia de *Salmonella* a un solo antibiótico, cloranfenicol, se notificó por primera vez a principios de los años sesenta, y a finales de los ochenta el serovar Typhimurium definitivo tipo 4 (DT104), mostró resistencia frente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclinas (Montville & Mathews, 2008).

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, consta de dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, que a su vez se divide en seis subespecies: *Salmonella enterica* subespecie Enterica, *Salmonella enterica* subespecie Salamae, *Salmonella enterica* subespecie Arizonae, *Salmonella enterica* subespecie Diarizonae, *Salmonella enterica* subespecie Houtenae y *Salmonella enterica* subespecie Indica (Falush et al., 2006; Torpdahl & Ahrens, 2004). Las especies de *Salmonella* se clasifican por serología, definido por la combinación de antígenos de superficie O, H y Vi, de acuerdo con el esquema de Kaufmann-White-Le Minor, lo que ha permitido la separación de 2659 serotipos o serovares de *Salmonella* (Grimont & Weill, 2007; Issenhuth-Jeanjean et al., 2014) (ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Posición taxonómica y nomenclatura del género *Salmonella*

Especie	Subespecie	Serovares/serotipos	No. de serovares en cada especie o subespecie
<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (subespecie I)	Enteritidis, Typhimurium, Typhi, Paratyphi, Choleraesuis	1586
	<i>salamae</i> (subespecie II)	9,46:z:z39	522
	<i>arizonae</i> (subespecie IIIa)	43:z29:-	102
	<i>diarizonae</i> (subespecie IIIb)	6,7:l,v:1,5,7	338
	<i>houtenae</i> (subespecie IV)	21:m,t:-	76
	<i>indica</i> (subespecie VI)	59:z36:-	13
<i>bongori</i>	-	13,22:z39:-	22
Total			2659

1.3 Características generales

Los miembros de este género son bacilos Gram-negativos, aerobios facultativos, móviles (Sterzenbach, Crawford, Winter, & Bäumlér, 2013), excepto *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar gallinarum y *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar pullorum (Moxley, 2013). Poseen una pared celular compuesta de lipopolisacárido (LPS) y proteínas, en la cual se encuentran los antígenos somáticos (antígenos O), junto con los determinantes antigénicos de superficie de los flagelos (antígenos H) y antígenos polisacáridos de cápsula (Vi) definen al serotipo, por la combinación única de antígenos somáticos O y flagelares H1 y H2 presentes en el género *Salmonella* (Grimont & Weill, 2007; Moxley, 2013).

Salmonella enterica, que causa infección en humanos y animales, se divide en dos grupos: a) *Salmonella* que causan fiebre tifoidea como: *Salmonella enterica* serotipo Typhi (restringido o adaptado a humanos), *Salmonella enterica* serotipo Sendai y *Salmonella enterica* serotipo Paratyphi A, B, C., y b) *Salmonella* no tifoidea (NTS) como: *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y otras (amplio rango de hospederos) que causan gastroenteritis o enfermedad sistémica y son de interés zoonótico (Langridge, Wain, & Nair, 2012).

1.4 Epidemiología

En la década de 1960, *S. Enteritidis* se estableció en aves de corral, coincidiendo con la erradicación de patógenos aviarios como *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* (Bäumler, Hargis, & Tsolis, 2000). Tanto en países en vías de desarrollo como desarrollados la salmonelosis causada por NTS es una infección potencialmente zoonótica, comúnmente asociada con gastroenteritis y representa un problema para la salud pública y, más aún, con la aparición de serotipos de *Salmonella* multirresistentes a fármacos (MDR, por sus siglas en inglés) (Eng et al., 2015; Majowicz et al., 2010).

La real evolución de la situación epidemiológica podría verse afectada por la falta de notificación en diferentes países. En la mayoría de países no existen sistemas formales de vigilancia para la salmonelosis humana y los datos se limitan a estudios específicos (Wagenaar, Hendriksen, & Carrique-Mas, 2013). Por lo tanto, el número de casos de salmonelosis tanto humana como animal puede estar subestimado. Sin embargo, datos de vigilancia permite realizar comparaciones e identificar tendencias, reservorios y rutas de transmisión de los serovares de *Salmonella* (Shivaprasad, Methner, & Barrow, 2013).

1.4.1 Distribución e Importancia

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) reporta que la salmonelosis sigue siendo la segunda zoonosis más común en humanos en la UE (EFSA & ECDC, 2016). En 2015, la Unión Europea (UE) notificó un aumento de 1,9% (21,2 casos/100 000 habitantes-año) de salmonelosis humana, en comparación con 2014, principalmente ocasionado por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- monofásico y *S. Infantis* (EFSA & ECDC, 2016).

Con la implementación obligatoria, desde 2008, de un programa nacional de control en los Estados Miembros (MS, por sus siglas en inglés) de la UE, en 2015, se observó una prevalencia de *Salmonella* spp. de 2,22% (7054/317 738) en parvadas de pollos de engorde, presentando *S. Enteritidis* 0,17% (540/317 738) y *S. Typhimurium*, incluyendo las variantes monofásicas 0,10% (318/317 738) (EFSA & ECDC, 2016). También, *S. Infantis*, *S. Enteritidis* y *Salmonella* Mbadaka se confirmaron como los serovares más frecuentes en pollos de engorde, representando 38,7% (1089/4668), 11,6% (541/4668) y 7,2% (336/4668) de los aislamientos respectivamente (EFSA & ECDC, 2016). En 2015, el mayor número de aislamientos de *S. Infantis* a partir aves de corral ocurrió en Italia (719 aislados), Rumania (682), Eslovenia (166), Croacia (94) y Austria (86) (EFSA & ECDC, 2016).

En Norte América en 2002, *S. Typhimurium* (29%) fue el serotipo más frecuentemente reportado en aislados clínicos, seguido por *S. Enteritidis* (21%) (Galanis et al., 2006). En Canadá, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (incluido variedad 5-) (Flockhart et al., 2016), han desplazado a *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Hadar* y *S. Schwarzengrund* quienes eran, anteriormente, los más prevalentes en granjas de pollos de engorde (Poppe, Irwin, Forsberg, Clarke, & Oggel, 1991). FoodNet Canadá (FNC), en un periodo de 2006 a 2011, notificó una tasa de incidencia de 15 casos/100 000 personas/año, además, reportó una prevalencia de *Salmonella* spp. de 93% (43/46) en granjas de pollos de engorde (Flockhart et al., 2016). En 2014, en Estados Unidos, *Salmonella* spp. fue cuasante de 140 brotes, *S. Enteritidis* fue el más común (40 brotes), seguido por *S. Typhimurium* (15), *S. Javiana* (6) y *S. Newport* (6); además, 11 (7,9%) brotes se asociaron con aves de corral (CDC, 2016). En 2016, el CDC notificó brotes de *Salmonella* causados principalmente por *S. Infantis*, seguido por *S. Enteritidis* (CDC, 2017).

La mayoría de países en vías de desarrollo no recopilan datos sobre prevalencia y distribución de serovares de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en alimentos, animales o piensos (Wagenaar et al., 2013). En América Latina y el Caribe, en 2002, se reportaron aislamientos de *S. Enteritidis* (más común), *S. Typhimurium*, *S. Typhi*, *S. Montevideo* y *S. Paratyphi B*, como los más comunes en humanos (Galanis et al., 2006). Mientras que *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg*, *S. Mbandaka* y *S. Angona* fueron reportados entre los más comunes en no humanos (Galanis et al., 2006). En Brasil, desde 1962, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka* y *S. Kentucky* han sido los serotipos más comunes identificados en pollos de engorde (Duarte et al., 2009; Hofer, Filho, & da Reis, 1997; Kanashiro, Stoppa, Cardoso, Tessari, & Castro, 2005).

En América Latina, en los años 2000, el 66% de brotes de *Salmonella* en humanos ocurrió en Cuba, el 87% de todos los brotes fue reportado como *Salmonella* spp. y *S. Enteritidis* representó 8,5% (Pires, Vieira, Perez, Wong, & Hald, 2012). Desde los años 90 hasta los años 2000, la salmonelosis humana atribuida a pollos disminuyó de 9,7 a 4,8% (Pires et al., 2012). Los resultados sugieren que huevos y carne, particularmente de pollo y cerdo, además de verduras tienen mayor probabilidad de ser fuentes de brotes de *Salmonella* spp. (Pires et al., 2012). Así, la probabilidad de que sea causada por carne es de 23,7% (IC 95% 19,7-27,8) (Pires et al., 2012).

En 2015, en Ecuador, la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica notifica 2747 casos de salmonelosis humana (MSP, 2016). En la provincia de Galápagos se registró un caso (0,04%) del total de casos notificados a nivel nacional (MSP, 2016). Por otro

lado, en 2015, en un brote de salmonelosis humana se aisló *S. Infantis* con gen *blaCTX-M-65* (Cartelle-Gestal, Zurita, Paz y Mino, Ortega-Paredes, & Alcocer, 2016). A nivel de granjas de pollos de engorde se encontró una prevalencia de *Salmonella* spp. de 42% (50/119) (Vinueza-Burgos et al., 2016). Los serotipos más prevalentes reportados han sido *S. Infantis* y *S. Enteritidis* (Villagómez-Estrada et al., 2017; Vinueza-Burgos et al., 2016).

1.5 Aspectos de Salud Pública

Las ETAs son una causa importante de morbilidad y mortalidad, además de un impedimento significativo para el desarrollo socioeconómico en todo el mundo (WHO, 2015). Un sistema integrado de vigilancia de patógenos transmitidos por alimento debe tomar un enfoque de “Una Sola Salud” (Magwedere, Rauff, De Klerk, Keddy, & Dziva, 2015). Se estima a nivel mundial que aproximadamente 80,3 millones de 93,8 millones de casos de gastroenteritis por NTS que ocurre cada año son atribuidos a los alimentos (CDC, 2015; Majowicz et al., 2010). En EE.UU., *Salmonella* spp. es el principal patógeno transmitido por alimentos, con costos de 3,3 billones de dólares anuales para 1 millón de casos (Batz, Hoffmann, & Morris, 2014; Hoffmann, Batz, & Morris, 2012). Una estrategia general para asegurar la calidad del producto es una intervención en múltiples etapas, que incluye, desde la granja a la mesa (Gast, 2007).

Antes de 1960, la mayoría de aislados de *Salmonella* spp. a nivel mundial eran susceptibles a los antibióticos disponibles, pero desde 1962 cepas de *Salmonella* spp. resistentes a los antibióticos se han incrementado drásticamente (Rabsch, Simon, & Humphrey, 2013). Aproximadamente 2 millones de infecciones por bacterias resistentes a antibióticos (AR) ocurren anualmente en Estados Unidos, resultando en 23 000 muertes (CDC, 2013a).

La mayoría de los aislamientos de *Salmonella* serotipificados pertenecen a los serovares Enteritidis y Typhimurium (~80%), mientras el primero se asocia principalmente con huevos de gallina y pollo, el último es transmitido por carne de cerdo y productos cárnicos (Rabsch et al., 2013). Todos los serovares de *Salmonella* comunes en las aves de corral son considerados potencialmente patógenos para los seres humanos; sin embargo, algunos nunca están asociados con enfermedades humanas (Mead et al., 2010).

El surgimiento de serotipos de *Salmonella* en aves de corral ocurre principalmente por exclusión competitiva de otro serotipo (Rabsch et al., 2000). También, el control exitoso de un serovar permite que otro se convierta en predominante (Mead et al., 2010). Esto

ocurrió en Israel, donde la salmonelosis humana causada por los serovares Enteritidis y Typhimurium disminuyó y un nuevo clon de *S. Infantis* surgió en humanos, cuyo incremento está correlacionado con una elevada frecuencia del serovar Infantis reportada en pollos de engorde (Gal-Mor et al., 2010).

1.6 Diagnóstico de laboratorio

Las muestras para detectar *Salmonella* spp. en aves enfermas son: órganos como hígado y bazo, saco vitelino, sacos ciegos y médula ósea; sin embargo, las muestras para monitorear parvadas sanas son: heces, hisopos de polvo y zapatones (Hafez & Hauck, 2015; Moxley, 2013).

1.6.1 Aislamiento e identificación de serotipos de *Salmonella*

Un método estándar internacional, la norma ISO 6579:2002/Amd1 (ISO, 2002, 2007) se utiliza para detectar *Salmonella* spp. móviles a partir de contenido cecal de sacos ciegos, donde se colocan las muestras en un medio de pre-enriquecimiento no selectivo como el agua de peptona tamponada (BPW, por sus siglas en inglés). Para el enriquecimiento selectivo se utiliza un medio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV, por sus siglas en inglés) modificado, en el cual, si es positiva la placa, aparecerá una zona turbia blanca grisácea alrededor de la gota que se inocula en el medio, ya que existe migración de *Salmonella* spp. a través del medio; además, se siembra sobre otro medio selectivo sólido como la xilosa lisina desoxicolato (XLD) en cuya superficie se puede observar colonias con un centro negro (producción de sulfuro de hidrógeno) y una zona ligeramente transparente. La confirmación fenotípica por propiedades bioquímicas se realiza principalmente en agares diferenciales como: a) agar con triple azúcar y hierro (TSI, por sus siglas en inglés) que identifica organismos fermentadores o no de azúcares como glucosa, lactosa y sacarosa, b) agar lisina hierro (LIA, por sus siglas en inglés) que permite diferenciar cepas por su capacidad de decarboxilación o desaminación de lisina, c) medio de sulfuro indol para movilidad (SIM), usado para detectar movilidad y d) caldo urea para encontrar enzimas que alcalinicen el medio (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008; Worcman-Barninka, Destro, Fernandes, & Landgraf, 2001).

El método MSRV es utilizado para aislamiento de *Salmonella* spp. en alimentos, con un menor tiempo de procesamiento de la muestra en comparación con otros métodos recomendados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y muestra una sensibilidad de 71,4% y una especificidad de 99,2% (Worcman-Barninka et al., 2001).

1.6.2 Serotipificación

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica que se basa en reacciones de aglutinación antígeno-anticuerpo, ya que las cepas de *Salmonella* expresan una gran variedad de antígenos de superficie en su pared, fimbrias o cápsulas que reaccionan con los anticuerpos presentes en los sueros inmunes. Este método pone en evidencia la presencia de antígenos: somáticos (componentes de azúcar del LPS, antígenos O), flagelares como H1 y H2 (proteínas estructurales, antígenos H) y capsulares (antígenos Vi), que permiten identificar serovariedades en distintas zonas geográficas, fuentes de infección, vías de transmisión y/o brotes de infección (Caffer et al., 2008; ISO, 2014). El esquema de White-Kauffmann-Le Minor es el documento base para asignar nombres de serovares y fórmulas a los aislados de *Salmonella* spp. (Grimont & Weill, 2007; Issenhuth-Jeanjean et al., 2014; Wain & Olsen, 2013). El género *Salmonella* puede perder los componentes superficiales (antígenos de aglutinación) y ser clasificada de manera errónea, por lo cual, hace que el serotipado tenga un poder discriminatorio bajo y se requiera métodos adicionales de tipificación para la identificación de *Salmonella* spp. (Wain & Olsen, 2013).

1.6.3 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés)

PFGE es un método que se basa en cortar el ADN en lugares específicos (conocidos como sitios de restricción) utilizando una endonucleasa de restricción (XbaI, como enzima de restricción primaria; SpeI y NotI), para generar fragmentos de ADN que se puedan separar en función del tamaño a través de un campo eléctrico y generar un patrón de bandas (fragmentos de ADN entre 35 kb y 1140 kb de tamaño) en un gel de agarosa (CDC, 2013b; Ribot et al., 2006). PFGE es considerado una prueba de referencia para tipificación o caracterización molecular de una serie de cepas bacterianas (Jordan & Walker, 2015). Las huellas digitales de ADN, con un patrón específico de bandas generadas por PFGE, son de utilidad para detectar diferencias moleculares entre cepas estrechamente relacionadas (Wattiau, Boland, & Bertrand, 2011) o relaciones clonales dentro de los serotipos de *Salmonella* cuando se realiza investigación epidemiológica o se da seguimiento a brotes de ETAs (Jordan & Walker, 2015). PFGE, sin embargo, no siempre tiene una discriminación exitosa. Se requiere de una combinación de métodos diagnósticos para discriminar ciertos tipos que son genéticamente muy homogéneos (Ahmed et al., 2000). Además, es un método en el que se requiere invertir mucho tiempo para obtener resultados y requiere de equipos de alto costo, agentes químicos de calidad y personal capacitado (Imen, Ridha, & Mahjoub, 2012).

El PFGE no distingue los aislamientos en el mismo grado que puede lograrse mediante la secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés), por lo que, en la actualidad, WGS es utilizada para tener una visión epidemiológica más profunda de los patógenos.

1.7 Agentes antimicrobianos

A nivel mundial, los agentes antimicrobianos han sido utilizados en la cría de aves para la terapia, control de la colonización o profilaxis general contra una variedad de patógenos (Shivaprasad et al., 2013). Agentes antimicrobianos considerados promotores de crecimiento (AGPs, por sus siglas en inglés), que son administrados al ganado para mejorar el crecimiento y la eficiencia alimenticia, son utilizados como una práctica común globalmente, con un incremento entre 10 y 20 veces desde los años 50 (Brown, Uwiera, Kalmokoff, Brooks, & Inglis, 2016), y con beneficios reportados desde 1946 (Moore et al., 1946). La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) está promoviendo la reducción del uso de AGPs (Kuehn, 2014) por el problema de resistencia antimicrobiana en los microorganismos patógenos con consecuencias graves en la efectividad del tratamiento de enfermedades infecciosas (Shaikh, Fatima, Shakil, Rizvi, & Kamal, 2015).

1.8 Resistencia a los antimicrobianos

Durante más de 40 años se conoce que el uso de antibióticos en el ganado genera resistencia en microorganismos (Spelberg et al., 2016). La aparición y propagación de serotipos de *Salmonella* resistente a los antimicrobianos (AMR, por sus siglas en inglés) es una de las amenazas para la salud pública a nivel mundial (CDC, 2013a; Hur, Jawale, & Lee, 2012). La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) menciona que aproximadamente el 80% de los aislados de *Salmonella* spp. humana no presenta resistencia a los antibióticos probados y la resistencia a ceftriaxona, azitromicina y ciprofloxacina en cepas de *Salmonella* no tifoidea se mantienen por debajo del 3% (FDA & NARMS, 2016). Los antibióticos como ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol han sido usados como tratamientos de primera línea para infecciones de *Salmonella* spp. (Eng et al., 2015). Con la aparición de resistencia a los antibióticos tradicionales se han introducido quinolonas, fluoroquinolonas y cefalosporinas de espectro extendido (ceftiofur y ceftriaxona), y consecuentemente ha incrementado la presencia de aislados de NTS resistentes a estos fármacos (Hur et al., 2012). En Europa, se reportó que el 15% de aislado de NTS

presentaban fenotipo MDR y el 20% de los aislados eran resistentes al ácido nalidíxico, particularmente en *S. Enteritidis* (Meakins et al., 2008).

El uso excesivo (largos periodos de tiempo y en concentraciones erróneas) y/o el uso indebido (antimicrobiano incorrecto seleccionado para determinado fin) de antimicrobianos tanto en medicina veterinaria como en humana, ha conllevado a una creciente resistencia antimicrobiana (Alanis, 2005; Gilchrist et al., 2007). Además, si no se hace un adecuado uso de los antibióticos llegará una “era postantibiótica”, periodo en el que no habrá antimicrobianos eficaces disponibles para el tratamiento de muchas infecciones que ponen en peligro la vida de los seres humanos (Alanis, 2005; Gilchrist et al., 2007). Particularmente, en la industria avícola el amplio uso de promotores de crecimiento antimicrobiano no terapéuticos han aumentado los riesgos de aparición de cepas resistentes a los antibióticos (Saravanan et al., 2015) que están vinculadas con resistencia a los antibióticos que enfrentan las personas (Marshall & Levy, 2011).

El uso de fármacos antimicrobianos no inducen resistencia en las bacterias, si no elimina bacterias susceptibles y deja bacterias resistentes ya presentes en la población (Prescott, 2013). Los factores que están involucrados en la persistencia de estos agentes resistentes son la presión antibiótica selectiva, proliferación de clones resistentes y la falta de un método adecuado para detectar fenotipos emergentes (Cosby et al., 2015). Las bacterias pueden permanecer bajo la presión selectiva de cualquier antimicrobiano (Voss-Rech et al., 2016) y estimular la transferencia horizontal de genes, que codifican la síntesis de enzimas que modifican los antibióticos, para ampliar el número y variedad de organismos resistentes a los agentes antimicrobianos (Paulson & Zaoutis, 2015). También, la propagación clonal y persistencia de bacterias resistentes es observada en ausencia de presión selectiva de antibióticos (Holmes et al., 2016).

La resistencia antimicrobiana puede ser intrínseca (mutación espontánea del material genético) (Cosby et al., 2015) o adquirida (adquisición de genes de resistencia) mediante transformación (absorción de ADN desnudo), transducción (a través de virus bacterianos) y/o conjugación (transferencia de genes de resistencia mediada por plásmidos) (Prescott, 2013). Muchos de los genes de resistencia están localizados en elementos genéticos móviles, como los plásmidos R (plásmidos resistentes). Por lo tanto, pueden co-transferirse o co-seleccionarse, incluso, en ausencia de una presión selectiva de algún antimicrobiano (Michael, Butaye, Cloeckert, & Schwarz, 2006). La conjugación puede ocurrir no sólo entre especies pertenecientes a un mismo género (Morris & Potter, 2013), si no también entre diferentes géneros y familias de microorganismos, de modo que, se puede encontrar plásmidos similares en una amplia gama de bacterias no relacionadas (Prescott, 2013). La movilización de genes a otros

genomas bacterianos puede ocurrir por integrones (pueden integrar cassettes génicos de resistencia), que se encuentran en transposones, y a su vez en plásmidos o en el cromosoma bacteriano (Fluit & Schmitz, 2004).

La resistencia de *Salmonella* spp. a diferentes clases de agentes antimicrobianos está dado por la presencia de genes de resistencia que codifican diversos mecanismos de resistencia como: a) disminución de la captación de fármacos y modificación del fármaco para aminoglucósidos (Alcaine, Warnick, & Wiedmann, 2007), b) producción de enzimas β -lactamasas que inactivan los antibióticos β -lactámicos mediante la hidrólisis del enlace peptídico del anillo β -lactámico (Bush & Jacoby, 2010); c) activación de bomba de eflujo que elimina fenicoles (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001), d) codificación de enzimas que modifican estreptomicina y aminoglucósidos (Michael et al., 2006), e) expresión de dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa resistentes a sulfonamidas o trimetoprim respectivamente (Michael et al., 2006) y f) mutaciones de genes diana y eflujo activo para quinolonas y floroquinolonas (Cloekaert & Chaslus-dancla, 2001; Olliver, Vallé, Chaslus-Dancla, & Cloekaert, 2005).

1.8.1 Clasificación de β -lactamasas

Los antibióticos β -lactámicos inhiben las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular, es decir, las proteínas de unión a penicilina (PBP, por sus siglas en inglés) (Bonomo, 2016). Las β -lactamasas se identificaron por primera vez en cepas de *Staphylococcus aureus* a finales de la década de 1940 (Abraham & Chain, 1940).

Se han encontrado más de 2000 β -lactamasas de origen natural (Bonomo, 2016). Un enfoque estructural basado en la secuencia de aminoácidos agrupa a las enzimas en cuatro clases: β -lactamasas clases A, C y D que utilizan una serina para la hidrólisis de β -lactámicos, mientras que las metalo- β -lactamasas de clase B que requieren cationes de Zinc divalentes (Zn^{2+}) para catalizar la hidrólisis del sustrato (Bebrone, 2007; Bush & Jacoby, 2010). Estas clases de enzimas han sido descritas por varios autores (Hall & Barlow, 2005; Jacoby & Munoz-Prince, 2005; Majiduddin, Materon, & Palzkill, 2002; Philippon, Slama, & Labia, 2016).

a) La clase A: las β -lactamasas de amplio espectro que hidrolizan generalmente bencilpenicilinas, aminopenicilinas, penicilinas, carboxipenicilinas, cefalosporinas de primera generación son TEM-1, TEM-2, SHV-1. Por otro lado, las β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs, por sus siglas en inglés) que actúan sobre sustratos del grupo de amplio espectro más oxyimino-cefalosporinas y monobactam son las de la familia TEM y SHV o sobre sustratos del grupo de espectro extendido más cefepima son las de la familia CTX-M. Finalmente, las carbapenemasas que tienen actividad sobre los

sustratos del grupo de espectro extendido más cefamicinas y carbapenems son las KPC-1, KPC-2 y KPC-3.

b) La clase C: las AmpC cefalosporinas que tienen acción sobre sustratos del grupo de espectro extendido más cefamicinas son principalmente de la familia CMY.

c) La clase D: las β -lactamasas de amplio espectro que exhiben una hidrólisis de sustratos del grupo de amplio espectro más cloxacilina, metilcilina y oxacilina son las de la familia OXA.

d) La Clase B: las carbapenemasas o metalo- β -lactamasas (MBLs) que van a interferir en la acción de sustratos del grupo de espectro extendido más cefamicinas y carbapenems son las de la familia IMP y VIM, además de GIM-1 y SPM-1

1.8.2 Productoras de BLEE y AmpC

En la familia *Enterobacteriaceae*, el mecanismo principal de resistencia a los antibióticos β -lactámicos es la producción de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL o BLEE) y β -lactamasas de AmpC (Shahada et al., 2010). ESBL son enzimas que generalmente hidrolizan oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y cefepima) y monobactamas (aztreonam) pero no cefamicinas (cefexitina, cefotetan, y cefmetazole), y son inhibidas por ácido clavulánico (CVA, por sus siglas en inglés), sulbactam y tazobactam (Ghafourian, Sadeghifard, Soheili, & Sekawi, 2014; Shahada et al., 2010). Por el contrario, AmpC son enzimas que hidrolizan cefalosporinas, cefamicinas y el CVA no inhibe estas β -lactamasas (Livermore & Woodford, 2006). También, muchos organismos productores de ESBL pueden expresar β -lactamasas de AmpC (Poulou et al., 2014; Rupp & Fey, 2003).

En 1983, en Alemania se reportó una β -lactamasa capaz de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido en *Klebsiella pneumoniae* (Knothe, Shah, Krcmery, Antal, & Mitsuhashi, 1983). En el período 1997-1999, cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de ESBL fueron reportadas a nivel mundial y parecen ser comunes en muchos países de América Latina (Winokur, Canton, Casellas, & Legakis, 2001). El mecanismo exitoso de propagación de cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de ESBL es la difusión de la cepa clonal o el resultado de la evolución y propagación horizontal de genes de β -lactamasas mediada por plásmidos (Brolund & Sandegren, 2016; Patterson, 2003). Los plásmidos que codifican ESBL pueden albergar genes β -lactamasas adicionales, así como, genes que confieren resistencia a otras clases de antibióticos (Carattoli, 2009; Patterson, 2003).

1.8.3 Tipos de ESBL importantes

Las ESBL surgen principalmente debido a mutaciones del grupo de genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M que codifican estas enzimas (López-Velandia, Torres-Caycedo, & Prada-Quiroga, 2015).

a) TEM- β -lactamasa

Existen más de 100 β -lactamasas tipo TEM (β -lactamasa temoneira para hidrólisis de cefalosporinas de tercera generación) que son ESBLs y derivan de TEM-1 y TEM-2 que no son ESBLs (Ghafourian et al., 2014). Se encuentran principalmente en *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* y otras bacterias Gram-negativas con frecuencia creciente (Mamza & Msheila, 2016). En 1988, en Estados Unidos se reportó por primera vez una ESBL en *K. pneumoniae* con TEM-10 (Jacoby, Medeiros, O'Brein, Pinto, & Jiang, 1988).

b) SHV- β -lactamasa

Se conoce más de 100 variedades SHV (β -lactamasa variable de sulfhidriilo) que derivan de SHV-1 por sustitución de serina por glicina en la posición 238 o cambian lisina a glutamato en la posición 240 (Ghafourian et al., 2014). La β -lactamasas tipo SHV se encuentran en una amplia gama de cepas de *Enterobacteriaceae* (Drieux, Brossier, Sougakoff, & Jarlier, 2008).

c) CTX-M- β -lactamasa

Una nueva familia ESBL llamada CTX-M (β -lactamasa que hidroliza y confiere resistencia a cefotaxima) surgió casi simultáneamente en Alemania y Argentina, con mayor actividad contra cefotaxima en lugar de ceftazidima (Bauernfeind et al., 1992; Bauernfeind, Schweighart, & Grimm, 1990). Existen cinco grupos de enzimas CTX-M clasificadas por similitud de secuencias de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 (Bonnet, 2004; Livermore et al., 2007). Se encuentran en diversas enterobacterias como *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* (Ghafourian et al., 2014). Las enterobacterias productoras de CTX-M son endémicas en América Latina, ampliamente distribuidas desde al menos 1989, incluso ahora en muchos países europeos (Cantón & Coque, 2006; Radice, Power, & Conza, 2002; Tzouveleakis, Tzelepi, Tassios, & Legakis, 2000). Las ESBL de tipo CTX-M comparten solo 40% de homología con enzimas TEM o SHV (Minarini, Gales, Palazzo, & Darini, 2007). En América Latina, en los primeros años de este siglo, pasó a ser el primer continente donde las variantes de TEM y SHV fueron desplazadas por las variantes de CTX-M (Cantón & Coque, 2006).

1.8.4 Enzimas AmpC cefalosporinasas

Las β -lactamasas CMY-2 (cefamicinasas) que son de amplio espectro y la mayoría resistente al ácido clavulánico se han encontrado principalmente en *E. coli* y *Salmonella* spp. (Prescott, 2013). Desde 1988 cepas de *Salmonella* spp. son resistentes a cefalosporinas de espectro extendido (ESCs, por sus siglas en inglés), mientras CMY-2 se encuentra más diseminada en serotipos de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (Arlet et al., 2006).

1.9 Pruebas de resistencia antimicrobiana

Existen dos métodos *in vitro* utilizados principalmente para detectar mecanismos de resistencia entre los patógenos y estos son: el método de dilución utilizada para dar información cuantitativa y el método de difusión utilizada para proporcionar información cualitativa o semicualitativa (Moxley, 2013).

1.9.1 Método de microdilución en caldo (BMD, por sus siglas en inglés)

El método BMD que determina la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) se utiliza para probar *in vitro* la actividad de nuevos agentes antimicrobianos o determinar la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Para la interpretación de los valores de la MIC en *Salmonella* spp. se utilizó criterios del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés) (EUCAST, 2017) o del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) a partir de valores de corte epidemiológico (ECOFF) del EUCAST y del CLSI (CLSI, 2017; EUCAST, 2017), que toman en cuenta criterios de susceptibilidad inherente al fármaco, propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, dosificación, sitio de infección y toxicidad del fármaco (Moxley, 2013). El valor de MIC que representa la concentración necesaria de un antibiótico para inhibir el crecimiento de una población bacteriana (organismos infectantes), en particular, no es predictivo de la eficacia clínica (Olson, Ceri, Morck, Buret, & Read, 2002).

1.9.2 Método de difusión en agar en doble disco

El método de difusión en agar en doble disco se utiliza para probar *in vitro* la actividad de enzimas β -lactamasas (producida por *Salmonella* spp.) que hidrolizan la mayoría de penicilinas y cefalosporinas incluyendo compuestos oximino- β -lactam (cefalosporinas de tercera y cuarta generación y aztreonam) pero no cefamicinas o carbapenems y, la actividad de ESBL es inhibido por el ácido clavulánico (CLSI, 2015; EUCAST, 2015; Giske et al., 2013). Se utiliza concentraciones estándar de un cultivo puro del microorganismo en un agar apropiado y discos de papel filtro que contienen

concentraciones conocidas de antibióticos que se colocan sobre el cultivo del patógeno en agar (Moxley, 2013). Para la interpretación se compara la zona de inhibición alrededor del disco de la cefalosporina (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefepima) con ácido clavulánico con la zona alrededor del disco de la cefalosporina sola, dando positivo a ESBL si la diferencia es ≥ 5 mm (Giske et al., 2013).

Para confirmar el tipo de β -lactamasa o si es un “verdadero ESBL” se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) convencional específica del gen, seguida de secuenciación (CLSI, 2015; EUCAST, 2015; Giske et al., 2013).

1.9.3 Método de PCR convencional o de punto final

El método de PCR es una técnica molecular basada en hibridación y amplificación de ADN mediante un proceso térmico, para lo cual, se requiere de una enzima termoestable (ADN polimerasa), cebadores específicos (nucleótidos de amplificación), dinucleótidos, y un marcador molecular para detectar genes que codifican enzimas que confieren resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, β -lactámicos u otros antibióticos de interés (Georgios, Egki, & Effrosyni, 2014; Odumeru & León-Velarde, 2012; Zadernowska & Chajęcka, 2012). Esta herramienta puede ser aplicada cuando se buscan cepas de bacterias que se sospecha que tienen genes de resistencia a antibióticos, ya que, por otros métodos de susceptibilidad antimicrobiana han dado positivos (Georgios et al., 2014).

1.9.4 Secuenciación

La secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es una técnica más completa para determinar los genotipos, así como clones dentro de poblaciones de microorganismos, patógenos o no, alelos de loci de resistencia, análisis genéticos de poblaciones (Didelot & Falush, 2007; Kingdom, 1998). Sin embargo, tiene alto costo y falta de resolución temporal ya que en algunos casos no se puede determinar cuando ocurrió una divergencia por el hecho de encontrar diferencia de un solo nucleótido en dos aislamientos (Feldgarden, 2010). Además, los productos de PCR (amplicones) positivos a ciertos genes de resistencia a los antibióticos pueden ser secuenciados por el método de secuenciación de terminación de cadena dideoxy de Sanger que se basa en el uso de dideoxinucleótidos (ddNTP's) además de los nucleótidos normales (NTP) encontrados en el ADN (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). Esta herramienta permite diferenciar variantes de los genes β -lactamasas, por comparación con secuencias de la base de datos del GenBank (Chon et al., 2015) o ResFinder 3.0 (Zankari et al., 2012).

2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.4 Descripción de la zona de estudio

El estudio se realizó en la Isla Santa Cruz del Archipiélago de Galápagos durante la temporada de invierno, donde la temperatura osciló entre 24°C y 33°C y la humedad relativa estuvo entre 73 y 75%. Esta isla está localizada en el centro del conjunto de islas con un área de 986 km² y una altitud máxima de 864 msnm (Galápagos Conservancy, 2017).

2.5 Diseño del estudio

Se realizó un estudio transversal observacional. El muestreo se llevó a cabo entre el 29 de febrero y 26 de abril de 2016, muestreando todas las granjas de pollos de engorde de la Isla Santa Cruz (n = 22). El número de aves varió de 320 a 3894 pollos de engorde por galpón. Durante el muestreo se registró la información en un cuaderno de campo que contenía datos de la parvada, procedencia, tipo de muestra, fecha y hora de muestreo (**Anexo A**). A cada muestra se le asignó un código alfanumérico (G1A a G22A), conforme se llevó a cabo el muestreo en las 22 granjas. De manera sistemática, durante la evisceración, se colectaron 25 sacos ciegos de pollos de engorde de 3 a 6 semanas de edad por granja. Las muestras se colocaron en fundas plásticas estériles y en un *cooler* para mantener condiciones isotérmicas durante el transporte vía aérea hasta llegar a los laboratorios de la Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianos (UNIETAR) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, en Quito. Las muestras se procesaron 35 horas después, en promedio, de la recolección y se continuó con el análisis de acuerdo a un diagrama (**Anexo B**). Las muestras se analizaron siguiendo directrices de protocolos estándar con apoyo de esquemas utilizados en UNIETAR.

2.6 Procedimiento de laboratorio

2.3.1 Método de aislamiento e identificación para *Salmonella* spp.

El aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. se llevó a cabo según la norma ISO 6579:2002/Amd1 (E) (ISO, 2002, 2007) (**Anexo C**). Un gramo de contenido cecal de cada ciego (del conjunto de 25 ciegos) se tomó hasta llegar a 25 g, se homogenizó manualmente por 2 minutos y se pre-enriqueció con 225 ml de agua peptonada bufferada (BPW; Difco, EE.UU.) a 37°C ± 1°C por 18 a 24 h, como una etapa de pre-enriquecimiento. Después de la incubación, tres gotas (30 µl) del cultivo de BPW se

inocularon de forma equidistante en un medio modificado semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV; LabM, UK) que contenía 0,01% de novobiocina y se incubó a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 o 48 h, para el enriquecimiento selectivo. Se consideró positivo cuando un halo opaco blanco grisáceo, por movilización de *Salmonella* spp., fue observado desde los puntos de inoculación. Se sumergió un asa justo dentro del borde opaco y se retiró asegurando de no llevar medio MSRV para inocular la superficie de un medio selectivo, agar xilosa lisina desoxicolato (XLD; Difco, EE.UU.), que se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 h. Las colonias con un centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo en agar XLD se identificó como *Salmonella* spp. La identidad de las colonias de *Salmonella* spp. aisladas fue confirmada fenotípicamente por sus propiedades bioquímicas en agares diferenciales, tales como Triple Azúcar Hierro (TSI; Bio-Rad, Francia), Lisina Hierro Agar (LIA; Difco, DB), Sulfuro Indol Movilidad (SIM; Difco, DB) y caldo urea (Difco, EE.UU.). Después de la incubación por 24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, las pruebas de TSI, LIA y SIM positivas y, caldo urea negativa indicaron de que se trataba de *Salmonella* spp. Los aislados se almacenaron a -80°C e ingresaron a la colección de cultivos de especies del género *Salmonella* de la UNIETAR.

2.3.2 Método de serotipificación para *Salmonella* spp.

La serotipificación se realizó en base a un método internacional para serotipificación de *Salmonella* spp., ISO/TR 6579-3 (ISO, 2014) siguiendo las instrucciones del fabricante de los antisueros mediante dos esquemas (Difco, EE. UU.) (**Anexo D**). Las colonias confirmadas bioquímicamente como *Salmonella* spp. se serotipificaron utilizando antisueros comerciales para *Salmonella* spp. según el esquema de tipificación Kauffmann-White (Grimont & Weill, 2007). La serotipificación somática se realizó por aglutinación en portaobjetos para detectar antígenos somáticos O mediante antisuero comerciales polivalente somático de grupo O (Difco, EE. UU.). Se utilizó el método de puente de papel para la inversión de fase de *S. Infantis* y *S. Typhimurium* (Chiou et al., 2006), para finalmente realizar la serotipificación flagelar con el objetivo de detectar antígenos flagelares (H) por aglutinación en tubo mediante antisueros comerciales de factor H (Difco, EE.UU.). *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Infantis* GTC.2MA se utilizaron como controles positivos. Además, la cepa *E. coli* ATCC 25922 se utilizó como control negativo. Dos cepas de *Salmonella* spp. cuyo serotipo no fue identificado se enviaron para su identificación en los laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Gante, Bélgica.

2.3.3 Método de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria, de acuerdo con las directrices de CLSI (CLSI, 2012). Para esto se utilizaron placas de Sensititre® específicas para *Salmonella* spp. y *E. coli* (EUVSEC) que contienen 14 antimicrobianos de 13 clases con sus rango de concentración ($\mu\text{g/ml}$) correspondientes y siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, West Palm Beach, EE.UU.) (**Anexo E**). En este estudio se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas del género *Salmonella* con 5 antimicrobianos de 4 clases: ampicilina (AMP: 1 a 64 $\mu\text{g/ml}$), cefotaxima (FOT: 0,25 a 4 $\mu\text{g/ml}$), ceftazidima (TAZ: 0,5 a 8 $\mu\text{g/ml}$), meropenem (MERO: 0,06 a 16 $\mu\text{g/ml}$) y colistina (COL: 1 a 16 $\mu\text{g/ml}$). La cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 se utilizó como control negativo. Las cepas se consideraron resistentes por su capacidad de sobrevivir a una concentración dada de los antibióticos probados, utilizando criterios del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) a partir de valores ECOFF del EUCAST (EUCAST, 2017).

2.3.4 Método de PCR de punto final para detectar genes del grupo *bla*TEM-1, *bla*SHV, *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-8, *bla*CTX-M-9, *bla*KPC y *bla*CMY-2

De acuerdo a los resultados de las prueba de microdilución en caldo, se realizaron pruebas de PCR para identificar genes del grupo *bla*TEM-1, *bla*SHV, *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-8, *bla*CTX-M-9, *bla*KPC y *bla*CMY-2 en serotipos del género *Salmonella* resistentes a los antibióticos β -lactámicos. Se utilizaron secuencias de *primers* (o cebadores) específicos, siguiendo el protocolo estándar para la amplificación descrito en el **Anexo F**, que se basa en varios autores (Arlet et al., 2006; Hasman, Mevius, Veldman, Olesen, & Aarestrup, 2005; Kruger et al., 2004; Olesen, Hasman, & Aarestrup, 2004) (**Anexo H**). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 25 μl mediante el siguiente programa: 94°C durante 4 min seguido por 35 ciclos de: 1 min a 94°C (temperatura de desnaturalización), 1 min a 60°C (temperatura de hibridación), 1 min a 72°C (temperatura de elongación) y un paso final con 10 min de extensión a 72°C. Como controles positivos se utilizaron extracciones de ADN de las siguientes cepas: 4CT20A (para el gen *bla*TEM-1), TIAC (*bla*SHV), CTX-M-1-A (*bla*CTX-M-1), CTX-M-2-A (*bla*CTX-M-2), CTX-M-8-A (*bla*CTX-M-8), CTX-M-9-A (*bla*CTX-M-9), KPC-A (*bla*KPC) y TIAC811 (*bla*CMY-2) que llevan los diferentes tipos de genes β -lactamasas. También, se utilizó el marcador de tamaño molecular de ADN de 100 pb (Promega, EE.UU.). Los productos de PCR amplificados (amplicones) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/vol) que contuvo SYBR® SAFE (1

µl/10 ml) en tampón Tris-Borato EDTA (TBE). Las bandas de ADN se observaron irradiando el gel con un transiluminador UV (ENDURO™, Labnet) a 302 nm de longitud de onda. Los geles se documentaron mediante fotografías digitales. Se consideró positivo cuando el tamaño de la banda del gen objetivo de cada muestra fue similar al control positivo. Los productos de PCR se sometieron a secuenciación directa.

2.3.5 Secuenciación de los genes β-lactamasa amplificados por PCR

Los geles con los amplicones de PCR (*forward*) de los genes del grupo *bla*TEM-1 y *bla*CTX-M-9 se colocaron en microplacas de PCR (Axigen ®) y se enviaron a los laboratorios de Eurofins Genómica (proveedor internacional de servicios de secuenciación de ADN, Korea del Sur) para la secuenciación según el método de Sanger. Las secuencias en este estudio se compararon con las secuencias publicadas en la base de datos de ResFinder 3.0, del Centro de Epidemiología Genómica, para determinar su identidad y similitud entre ellas (Zankari et al., 2012).

2.3.6 Método de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Las cepas aisladas de *Salmonella* spp. se sembraron en crio-viales de 2 ml con agar nutritivo y se incubaron a 37°C ± 1°C por 24 h. Posteriormente, se enviaron a los laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Gante, Bélgica, para ser analizadas por el método de PFGE. Para caracterizar la diversidad o similitud genética entre serotipo del género *Salmonella* se utilizó PFGE con una enzima de restricción primaria, XbaI (CDC, 2013b). Las bandas que presentaron fragmentos entre 35 kb y 1140 kb de tamaño se incluyeron en el análisis. Para determinar la similitud entre las huellas o patrones de ADN de las cepas de *Salmonella* spp. se utilizó el coeficiente Sørensen-Dice con una tolerancia de posición de banda de 1% y 0% de nivel de optimización. El método de los pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA) se aplicó para construir el dendrograma mediante el programa GelCompar II® versión 6.6. (Applied Maths, Bélgica). Cualquier diferencia en el patrón de bandas de ADN de los aislados se interpretó como un genotipo diferente (Barrett, Gerner-Smidt, & Swaminathan, 2006). Los genotipos se identificaron por sufijos numéricos después de una letra capital que indica el serotipo (por ejemplo, el genotipo I-1 correspondía al serotipo Infantis y al genotipo 1).

2.4 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

2.4.1 Técnicas de procesamiento de datos

Los datos obtenidos por los diferentes métodos de diagnóstico se ingresaron en tablas de: registro de aislamiento y de pruebas bioquímicas para identificación de *Salmonella* spp. (**Anexo G**), registro para serotipificación somática y flagelar de los aislados de *Salmonella* spp. (**Anexo H**), registro de la concentración mínima inhibitoria de serotipos de *Salmonella* para determinar resistencia antimicrobiana (**Anexo J**), registro de cuantificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y genes de resistencia en serotipos de *Salmonella* (**Anexo K**). Para el análisis de patrones generados por PFGE se construyó un dendograma utilizando el programa GelCompar II versión 6.6 (**Anexo L**).

2.4.2 Técnicas de análisis de datos

Los resultados obtenidos de la identificación serológica, resistencia fenotípica y genotípica (genes del grupo *bla*TEM-1 y *bla*CTX-M-9 y variantes de genes del grupo *bla*TEM-1 y *bla*CTX-M-9) a los antibióticos probados, y genotipos del género *Salmonella* aislados en granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz del Archipiélago de Galápagos se ingresaron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel versión 2013 (**Anexo M**) para realizar tablas dinámicas que facilitaron el análisis de frecuencias.

2.4.3 Análisis estadístico

Se realizó estadística básica descriptiva para determinar tasas (%) de: serotipos, patrones de resistencia, genes de resistencia, variantes de genes de resistencia y genotipos en serotipos de *Salmonella*.

3 RESULTADOS

3.4 Serotipos del género *Salmonella*

De 22 granjas de pollos de engorde muestreadas en la Isla Santa Cruz del Archipiélago de Galápagos, se aislaron 7 (31,82%, 7/22) cepas de *Salmonella* spp. (**Anexo G**), de los cuales se identificaron 5 serotipos de *S. Infantis* (71,4%, 5/7), un serotipo de *S. Mbandaka* (14,3%, 1/7) y un serotipo de *S. Schwarzengrund* (14,3%, 1/7) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Tasa de serotipos de *Salmonella* identificadas a partir de 7 cepas de *Salmonella* spp. aisladas de 22 granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz, Galápagos

Serotipos	Fórmula antigénica	Tasa (%)
<i>S. Infantis</i>	O: 6,7; H1: r; H2: 1,5	5/7 (71,43)
<i>S. Mbandaka</i>	O: 6,7,14; H1: z ₁₀ ; H2: e,n,z ₁₅ ; [z ₃₇], [z ₄₅]	1/7 (14,29)
<i>S. Schwarzengrund</i>	O: <u>1,4,12,27</u> ; H1: d; H2: 1, 7	1/7 (14,29)

Nota. La fórmula antigénica de acuerdo al esquema de White-Kauffmann-Le Minor sobre la base de los componentes antigénicos; O: = antígeno somático O; H1: = antígeno flagelar H fase 1; H2: = antígeno flagelar H fase 2; los números indican los factores del antígeno O; letras minúsculas seguidas algunas veces por un subíndice numérico indican los factores de la fase 1 del antígeno H; los números arábigos o letras minúsculas señalan factores de la fase 2 del antígeno H.

3.5 Resistencia antimicrobiana

3.5.1 Fenotípica

Los serotipos de *S. Mbandaka* y *S. Schwarzengrund* presentaron un fenotipo susceptible a todos los antibióticos evaluados, por lo que sus resultados no se presentan en una tabla. Las tasas de resistencia a los antibióticos probados para los serotipos de *S. Infantis* se muestran en la Tabla 3. De los 5 serotipos de *S. Infantis*, 4 (80%) exhibieron un único patrón de resistencia AFT (ampicilina, cefotaxima y ceftazidima), demostrando poseer enzimas β -lactamasas.

Tabla 3. Tasas de resistencia a los antibióticos probados para los serotipos de *S. Infantis* (n =5)

Antibiótico	No <i>S. Infantis</i>	Tasa (%)
Ampicilina	4	4/5 (80)
Cefotaxima	4	4/5 (80)
Ceftazidima	4	4/5 (80)
Meropenem	0	0/7 (0)
Colistina	0	0/7 (0)

3.5.2 Genotípica

En todos los serotipos de *S. Infantis* que mostraron fenotipo de resistencia AFT (n = 4) se detectó el gen del grupo *bla*CTX-M-9 (ver **Figura 1**).

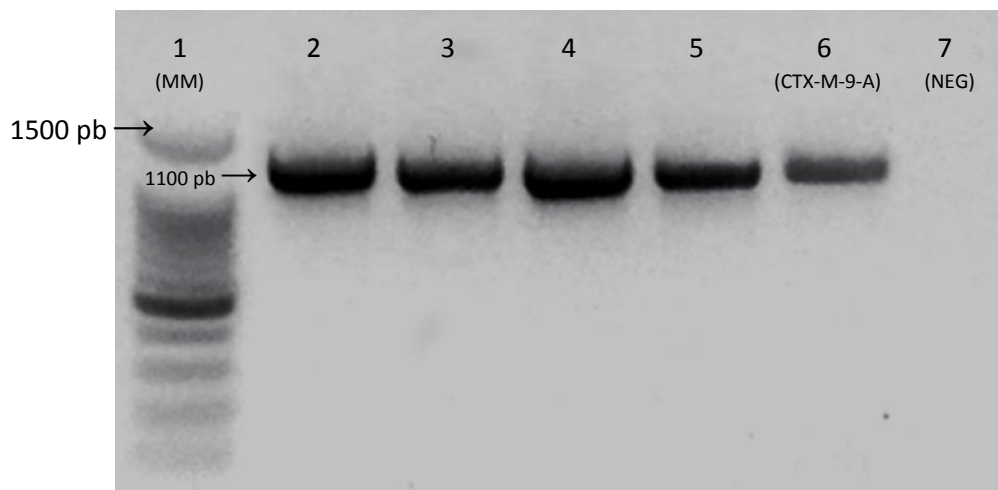


Figura 1. Amplificación por PCR de genes *bla*CTX-9 en 4 aislados de *S. Infantis*. Fragmento amplificado de 1100pb en gel de agarosa al 1% (TBE 0,5X); carril 1, marcador de ADN de 100pb (Promega, G2101, EE.UU.); carriles 2 a 5, ADN de serotipos de *S. Infantis*; carril 6, control positivo para el gen *bla*CTX-M-9; carril 7 control negativo; carriles 2 a 5, amplificación por PCR del gen *bla*CTX-M-9 de aislados de *S. Infantis*.

El gen del grupo *bla*TEM-1 se observó en 3 serotipos con fenotipo de resistencia AFT (ver **Figura 2**).

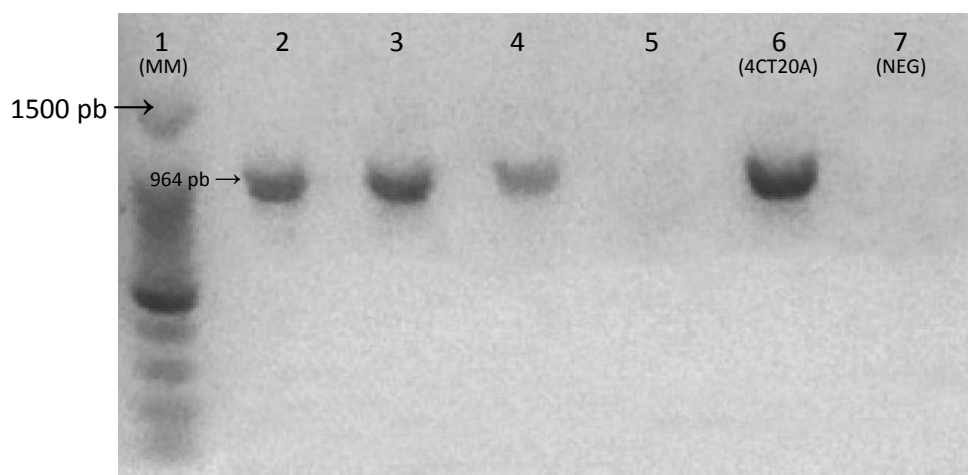


Figura 2. Amplificación por PCR de genes *bla*TEM-1 en 3 aislados de *S. Infantis*. Fragmento amplificado de 964pb en gel de agarosa al 1% (TBE 0,5X); carril 1, marcador de ADN de 100pb (Promega, G2101, EE.UU.); carriles 2 a 5, ADN de serotipos de *S. Infantis*; carril 6, control positivo al gen *bla*TEM-1; carril 7 control negativo; carriles 2 a 4 amplificación por PCR del gen *bla*TEM-1 en aislados de *S. Infantis*.

Los genes *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-8, *bla*SHV, *bla*CMY-2 y *bla*KPC no se encontraron en los serotipos de *S. Infantis* que presentaron un fenotipo de resistencia AFT. Las tasas de genes del grupo *bla*TEM-1 y *bla*CTX-M-9 se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Tasa de genes del grupo *bla*TEM-1 y *bla*CTX-M-9 en serotipos de *S. Infantis* con patrón de resistencia AFT (n = 4)

Serotipo	Gen <i>bla</i> TEM-1 (%)	Gen <i>bla</i> CTX-M-9 (%)
<i>S. Infantis</i>	3/4(75)	4/4 (100)

Nota. AFT = ampicilina, cefotaxima y ceftazidima; Genes del grupo *bla*TEM-1 y *bla*CTX-M-9 = genes con capacidad de codificar enzimas β-lactamasas de espectro extendido.

Mediante el método de secuenciación Sanger se confirmó el gen *bla*CTX-M-65 en todos los serotipos de *S. Infantis* del grupo *bla*CTX-M-9 (n = 4). Además, en los serotipos de *S. Infantis* con genes del grupo *bla*TEM-1 (n = 3) se encontró la presencia de las variantes *bla*TEM-1A (n = 2) y *bla*TEM-136 (n=1) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Variantes de genes β-lactamasa en serotipos de *S. Infantis* con genes del grupo *bla*CTX-M-9 (n = 4) y *bla*TEM-1 (n = 3)

Código	Primer	Variantes β-lactamasa	IC%
G12A	CTXG9F	<i>bla</i> CTX-M-65	99,17
G13A	CTXG9F	<i>bla</i> CTX-M-65	99,42
G15A	CTXG9F	<i>bla</i> CTX-M-65	98,39
G17A	CTXG9F	<i>bla</i> CTX-M-65	99,39
G12A	TEMfrP1	<i>bla</i> TEM-1A	99,64
G13A	TEMfrP1	<i>bla</i> TEM-1A	99,76
G15A	TEMfrP1	<i>bla</i> TEM-136	99,29

Nota. Código = código de los serotipos de *S. Infantis*; Primer = *forward*; variantes = variantes de genes del grupo *bla*CTX-M-9 y *bla*TEM-1; IC % = coeficiente de identidad.

3.6 PFGE

Mediante un dendograma de los patrones de bandas generados por PFGE de 7 serotipos de *Salmonella* analizadas se identificaron 5 genotipos, de los cuales 3 genotipos eran parte de 5 serotipos de *S. Infantis*, 1 de *S. Mbandaka* y 1 de *S. Schwarzengrund* (**Figura 3**).

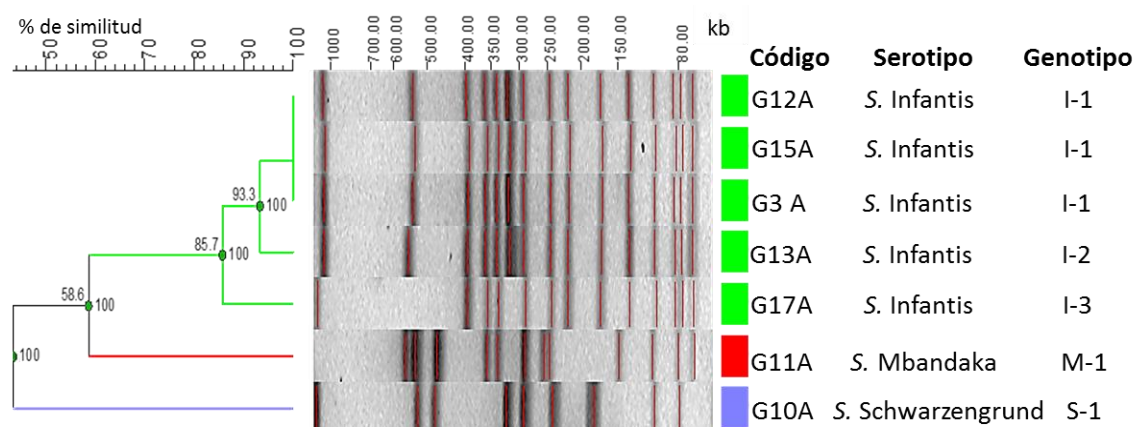


Figura 3. Dendograma de los patrones de bandas generados por PFGE de 7 serotipos de *Salmonella*. Los genotipos fueron identificados por una letra capital que indica el serotipo seguido por un sufijo numérico. Se destacó un grupo principal de *S. Infantis* con 3 genotipos diferentes provenientes de diferentes granjas. Además se detectó un genotipo para *S. Mbandaka* y un genotipo para *S. Schwarzengrund*. Para el análisis de similitud genética relativa se utilizó el coeficiente de Dice con una tolerancia de posición de banda de 1% y 0% de nivel de optimización. El método de los pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA) se aplicó para producir el dendograma. Cualquier diferencia en el patrón de bandas de ADN de los aislados se interpretó como un genotipo

S. Infantis, *S. Mbandaka* y *S. Schwarzengrund* pertenecieron a genotipos específicos. El genotipo I-1 perteneciente a *S. Infantis* fue el más dominante (43%) dentro de todos los genotipos (**Tabla 6**). La similitud genética entre genotipos de *S. Infantis* fue de 93,3 % y 85,7% por diferencia de una banda o pérdida de dos bandas en los perfiles obtenidos, respectivamente, y la similitud genética entre serotipos fue menor (**Tabla 6**).

Tabla 6. Tasa de genotipos presentes en cada serotipo de *Salmonella* con similitud genética intraserotipo y entre serotipos

Serotipo	Genotipo	Tasa (%)	Similitud genética (%)			
<i>S. Infantis</i>	I-1	3/7 (43)	93,3	87,5	58,6	<50
	I-2	1/7 (14)				
	I-3	1/7 (14)				
<i>S. Mbandaka</i>	M-1	1/7 (14)				
<i>S. Schwarzengrund</i>	S-1	1/7 (14)				

Nota. Genotipo identificado por un sufijo numérico después de una letra capital que indica el serotipo.

4 DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró resistencia a 3 antibióticos β -lactámicos (ampicilina, cefotaxima y ceftazidima) en serotipos de *S. Infantis* (4/5) aislados del contenido cecal de pollos de engorde procedentes de 22 granjas en la Isla Santa Cruz. La resistencia extremadamente alta (EFSA & ECDC, 2017) a cefotaxima y ceftazidima encontrada en el 80% (4/5) de *S. Infantis* estuvo dada por genes *bla*CTX-M-65, variante del grupo *bla*CTX-M-9. En Ecuador continental, Vinuesa-Burgos et al., (2016) encontraron genes del grupo CTX-M en 63,5% de *S. Infantis* aislados de granjas de pollos de engorde, sin embargo, no determinaron a que grupo *bla*CTX-M pertenecían. El gen *bla*CTX-M-65, una variante del gen *bla*CTX-M-14, fue identificada por primera vez en *E. coli* de un hospital Alemán en 2007 (GenBank número de acceso EF418608) y en 2008 *bla*CTX-M-65 fue reportado en un caso clínico en EE.UU. (Doi, Adams-Haduch, & Paterson, 2008), posteriormente se reportó en cepas de *E. coli* aislados de pollos en granjas de China (Yuan et al., 2009). En EE. UU., el gen *bla*CTX-M-65 en *S. Infantis* recuperado de carcasas de pollos (Tate et al., 2017) se encontró genéticamente relacionado con *S. Infantis* reportados en Italia (Franco et al., 2015). Además, en Ecuador el gen *bla*CTX-M-65 se observó relacionado con un brote de *S. Infantis* que se presentó en humanos (Cartelle-Gestal et al., 2016).

Este estudio es el primer reporte en Ecuador de resistencia a ampicilina encontrada en 60% de *S. Infantis* atribuida a la presencia del gen *bla*TEM-1, que confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación (Shahada et al., 2006). Los genes *bla*TEM-1, encontrados por primera vez en *S. Infantis* aislados de sacos ciegos de pollos de engorde en Japón, entre 1998 y 2003 (Shahada et al., 2006), también han sido reportados bandadas de pollos de engorde en Hungría, entre 2011 y 2013 (Szmolka et al., 2017). En Japón, el gen *bla*TEM-1 han mutado para desarrollar resistencia a cefotaxima y ceftazidima dando como resultado una variante de gen *bla*TEM52 (Shahada et al., 2010), la cual también se reportó en aves de corral en Bélgica, entre 2001 y 2004 (CloECKaert et al., 2007). Por otro lado, una variante de *bla*TEM-1, *bla*TEM-1A en *S. Infantis*, con capacidad de codificar enzimas ESBL, encontrada en este estudio y no muy difundida, ha sido reportado previamente en una cepa de *Salmonella* sp. aislada de pollos, en *E. coli* recuperada de cerdos en Dinamarca entre 2000 y 2001 (Olesen, Hasman, & Aarestrup, 2004), y en cepas de *Enterobacteriaceae* clínicas en

Polonia en 1998 (Baraniak et al., 2005). Un nuevo e interesante hallazgo en el presente estudio fue un serotipo de *S. Infantis* que alberga el gen *bla*TEM-136 ESBL, previamente notificada en *K. pneumoniae* en Italia entre 2002 y 2004 (Bagattini, 2006) y en *E. coli* y *Enterobacter* spp. aisladas entre 2005 y 2008 en Brasil (da Silva-Nogueira, Daur, de Messias-Reason, Gales, & Dalla-Costa, 2011) a partir de casos clínicos humanos.

Aunque no se tomaron muestras de contenido cecal de pollos de un día de edad provenientes del Ecuador, la presencia de *S. Infantis* portadores del gen *bla*CTX-M-65 del grupo *bla*CTX-M-9 en las granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz se podría presumir que se trata de una propagación de *S. Infantis* de Ecuador continental, ya que es el principal serotipo con presencia del gen *bla*CTX-M (Vinueza-Burgos et al., 2016) que proporciona resistencia alta a ampicilina y cefotaxima (Vinueza-Burgos et al., 2016). También, la presencia de *S. Infantis* con genes *bla*CTX-M-65 podría ser debido a la globalización, especialmente relacionado con viajes internacionales (Franco et al., 2015; Nógrády et al., 2012; Riccobono et al., 2015; Tate et al., 2017). Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar como *S. Infantis* ESBL ingresó a las granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz.

Para recuperar *S. Infantis* resistente a ampicilina, cefotaxima y ceftazidima, la presión de selección por parte de los antibióticos no necesariamente tiene que estar presente (Kameyama et al., 2012). Los serotipos de *S. Infantis* resistente a los antibióticos podrían ser mantenida por la mayor capacidad de colonización en el tracto intestinal (Asai et al., 2007), ya que contiene genes (*fimbriae ipf* y *K88-like*) asociados a la habilidad de colonización (Franco et al., 2015). Genes de resistencia antimicrobiana (*bla*CTX-M-65, *bla*TEM-1A y *bla*TEM-136) identificados en *S. Infantis* en el presente estudio podrían ser mantenidos ser por co-selección de antibióticos de mayor frecuencia (Franco et al., 2015) como las fluoroquinolonas, fármacos de mayor uso (61%) en granjas de pollos de engorde en Ecuador (de Janon-González, 2016). Asimismo, la presencia de genes *bla*CTX-M-65 frente a otros genes como *bla*CTX-M-14, (Kameyama et al., 2012), *bla*CTX-M-2 (Noda et al., 2015) y *bla*CTX-M-25 (Chuma et al., 2013) notificados en pollos de engorde, podría ser por cambios en la epidemiología de los plásmidos que codifican estos genes (Riccobono et al., 2015).

Asimismo, no se descarta la posibilidad de que los genes de resistencia encontrados en este estudio provenga de otras especies bacterianas (Zhao, Hu, Zhao, & Hu, 2013), principalmente de la familia *Enterobacteriaceae* (Ketrin Cristina da Silva & Lincopan, 2012), ya que se ha demostrado que la diseminación y persistencia del gen *bla*CTX-M-9 (Novais et al., 2006) y *bla*TEM (Fernandes et al., 2016; Szmolka et al., 2017) está dado por conjugación de plásmidos a través de integrones que contienen estos genes de

resistencia (Chuma et al., 2013). En particular, el gen *bla*CTX-M-65 ha sido prevalente en cepas de *E. coli* aisladas de pollos de engorde en Ecuador (Vinueza-Burgos, Cevallos, Cisneros, & De Zutter, 2017) y en China (Rao et al., 2014; Yuan et al., 2009). Por lo que se puede suponer que el gen *bla*CTX-M-65 presente en *S. Infantis* procedente de pollos de engorde es codificado por plásmidos y su éxito de propagación es debido a que no representan un costo biológico significativo al microorganismo para su transmisión y tienen la capacidad de mantenerse estable en ausencia de presión de selección de antibióticos (Riccobono et al., 2015). La mayor frecuencia de genes *bla*CTXM-65 en comparación con genes del grupo *bla*TEM-1, observada por primera vez en *S. Infantis* en Ecuador, puede ser consecuencia de diseminación de múltiples clones específicos, así como, por transferencia de elementos genéticos móviles (Cantón, Coque, & Baquero, 2003) que permiten una mayor propagación e incremento a nivel mundial de estos patógenos con genes del grupo *bla*CTX-M-9 (Cantón & Coque, 2006).

En Polonia, la resistencia a cefotaxima y ceftazidima en *S. Mbandaka* recuperados de granjas de pollos de engorde en 2009 y 2010 estuvo relacionada con genes del grupo *bla*CMY-2 (Hoszowski, Zając, Lalak, Przemysk, & Wasyl, 2016). Sin embargo, la mayoría de *S. Mbandaka* son pan-susceptibles (Shah, Paul, Sischo, Crespo, & Guard, 2016), lo que concuerda también con las observaciones realizadas en Brasil entre 2009 y 2010 (Voss-Rech et al., 2015) y con los resultados del presente estudio que mostraron que serotipos de *S. Mbandaka* en granjas de pollos de engorde no presentaron resistencia a los antibióticos β -lactámicos. También, otro hallazgo importante en este estudio fue la presencia de *S. Schwarzengrud* susceptible a los antibióticos β -lactámicos y colistina, resultados similares se obtuvieron en granjas de pollos de engorde en Brasil entre 2009 y 2010 (Voss-Rech et al., 2015), y en Japón entre 1999 y 2007 (Asai, Murakami, Ozawa, Koike, & Ishikawa, 2009). En contraste, un estudio en Brasil reportó *S. Schwarzengrud* con gen *bla*CTX-M-2 en granjas de aves de corral entre 2008 y 2009 (Silva et al., 2013).

En el presente estudio, los 4 serotipos de *S. Infantis* resistentes a ampicilina, cefotaxima y ceftazidima incluido un serotipo de *S. Infantis* que no presentó resistencia a los antibiótico β -lactámicos mostraron poca variabilidad genética intraserotípica considerándolos de esta manera subtipos potencialmente relacionados epidemiológicamente (Goering, 2010; Tenover et al., 1995). Por lo tanto, *S. Infantis* analizada en este estudio pertenece a un mismo grupo clonal mostrando una similitud genética de 87,5%. Los resultados de este estudio son comparables con los estudios llevados a cabo en pollos de engorde en Ecuador (Sánchez-Chugchilán, 2016; Vinueza-Burgos et al., 2016), Brasil (Voss-Rech et al., 2015), Japón (Shahada, Sugiyama,

Chuma, Sueyoshi, & Okamoto, 2010) e Italia (Franco et al., 2015), donde observaron un linaje clonal de *S. Infantis* productoras de ESBL. Asimismo, una diseminación clonal de *S. Infantis* resistente a ampicilina pero susceptible a cefotaxima ocurrió en la mayoría de países de la UE (Nógrády et al., 2012). También, en Alemania una diseminación clonal de *S. Infantis* fue observada en pollos de engorde y humanos (Hauser et al., 2012). La falta de variabilidad genética observado en estos serotipos de *S. Infantis* podría estar relacionada con algún ancestro reciente sin mayores cambios evolutivos o a su vez estar asociado con algún mecanismo que protege los reordenamientos genéticos y transferencias horizontales de genes (Hauser et al., 2012), apoyando así la hipótesis de que el uso de antibióticos pueda tener consecuencias a largo plazo (Feldgarden, 2010). Por otro lado, *S. Mbandaka* y *S. Schwarzengrund* al ser los únicos aislamientos reportados por primera vez en Ecuador, dificulta asociarlos con una fuente previamente presente en el país y podrían considerarse serotipos de origen internacional (Shah et al., 2016) que pueden establecerse en granjas de pollos de engorde como se ha demostrado en Brasil entre 2009 y 2010 (Voss-Rech et al., 2015) y en 2014 (Gelinski, Bombassaro, Baratto, & Vicente, 2014), y en varios países de la UE (EFSA & ECDC, 2016). En lo que se refiere a *S. Mbandaka*, en Polonia entre 2009 y 2010 se encontró relaciones genéticas cercanas entre *S. Mbandaka* de origen humano y avícola (Hoszowski et al., 2016).

En la presente investigación no se determinó el gen *blaSHV* en *S. Infantis*, ya que principalmente han sido reportados en otros serotipos de *Salmonella* como: *S. Enteritidis*, *Salmonella* Braenderup y *Salmonella* Livingstone (Chiaretto et al., 2008). Asimismo, *S. Infantis* que alberga genes *blaCMY-2* ha sido aislada de manera poco frecuente en pollos de engorde (Chuma et al., 2013; Taguchi et al., 2006); principalmente ha sido aislada en *S. Infantis* que no producen sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Sakano et al., 2013), por lo que podría explicarse la ausencia de este gen en el presente estudio, ya que los serotipos de *S. Infantis* eran productores de H_2S . La presencia del gene *blaKPC* en serotipos de *Salmonella* aislados de animales no ha sido reportada hasta el momento (Madec et al., 2017), lo que apoya los resultados de este estudio donde no se encontró en gen *blaKPC* *S. Infantis*. En Ecuador, la resistencia a colistina en serotipos de *S. Enteritidis* y *S. Infantis* reportados en granjas de pollos de engorde (Vinueza-Burgos et al., 2016) se puede atribuir a una modulación cromosómica para reducir la afinidad a las polimixinas (Paterson & Harris, 2016). Además, la resistencia a colistina mediada por el gen *MCR-1* solo se ha reportado en serotipos del género *Salmonella* del Grupo O:4 (B) (Webb et al., 2016), por lo que, se podría decir que hay cierto grado de protección a los serotipos del género *Salmonella* del grupo O:7 (C1) (*S. Infantis* y *S. Mbandaka*) encontrados en el presente estudio y del grupo O:9 (D1) (*S.*

Enteritidis) reportados por Vinueza-Burgos *et al.* (2016), pero no para *S. Schwarzengrund* (grupo O: 4) que podría estar diseminada en otras granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz. En Ecuador, *E. coli* resistente a colistina que alberga el gen *mcr-1*, fue aislada de un caso clínico humano, posiblemente adquirida en una área de producción intensiva de alimentos para animales (Ortega-Paredes, Barba, & Zurita, 2016). Por lo tanto, puede existir un potencial riesgo de propagación de este gen a *S. Schwarzengrund* (grupo O:4) a través de la conjugación de plásmidos (Park, Lee, Park, Ko, & Lee, 2017) como los de tipo IncI2 (Doumith *et al.*, 2016), pero se necesitan más investigaciones para confirmar esta suposición.

En general, este estudio demuestra la presencia de un clon de *S. Infantis* portador del gen *blaCTX-M-65*, *blaTEM-1A* y *blaTEM-136*, independientemente del uso de antibióticos β -lactámicos, distribuido en varias granjas de pollos de engorde, que podría propagarse a otras granjas, colonizar pollos de engorde (Franco *et al.*, 2015) y establecerse como un importante reservorio para transmitirse a los seres humanos, principalmente, a través de la cadena alimentaria (Almeida, Pitondo-Silva, Oliveira, & Falcão, 2013; Cloeckert *et al.*, 2007; Djefal *et al.*, 2017; Franco *et al.*, 2015; Hauser *et al.*, 2012; Noda, Murakami, Ishiguro, & Asai, 2010; Shahada *et al.*, 2010; Szmolka *et al.*, 2017). Además, considerando que estos genes de resistencia, posiblemente, son transportados en elementos genéticos móviles a través de la conjugación de plásmidos tipo pESI (Tate *et al.*, 2017) o tipo IncI1 (Riccobono *et al.*, 2015), la diseminación y persistencia en serotipos de *Salmonella* en aves de corral (Dionisi, Owczarek, Benedetti, Luzzi, & García-Fernández, 2016) puede ser resultado de un proceso alodémico (Cantón *et al.*, 2003), donde, la microbiota intestinal juega un papel importante como reservorio de genes de resistencia (Aviv, Rahav, & Gal-mor, 2016). Aunque, este clon de *S. Infantis* presente en pollos de engorde sigue siendo susceptible a fármacos como carbapenems y colistina, considerados de último recurso terapéutico, su fondo genético se ha configurado para resistir antibióticos β -lactámicos, comprometiendo de esta manera la salud pública, ya que limita la elección de fármacos efectivos para el tratamiento de salmonelosis humana. Por otro lado *S. Mbandaka* (formadora de *biofilm*) (Marin, Hernandez, & Lainez, 2009) y *S. Schwarzengrund* (invasiva en seres humanos) (Crump *et al.*, 2011) por su facilidad de propagarse en granjas de pollos de engorde, contaminar líneas de sacrificio y producto terminado, para posteriormente permanecer en recirculación (Chen, Hwang, Wang, Shih, & Tsen, 2011) también pueden poner en peligro la salud pública.

La adquisición de genes *blaCTX-M-65*, *blaTEM-1A* y *blaTEM-136* por parte de *S. Infantis* y su potencial propagación clonal requiere tomar medidas eficaces, con una perspectiva

de Una Sola Salud, con respecto a la resistencia antimicrobiana que es un problema emergente de salud pública, ya que limita las opciones de tratamiento para la salmonelosis humana (Hassan et al., 2016; McDermott et al., 2016). También, con la presencia de *S. Mbandaka* y *S. Schwarzengrund*, un nuevo escenario epidemiológico podría ocurrir por diseminación de un clon en particular y adquisición de elementos genéticos móviles de resistencia antimicrobiana como genes MCR-1 de *E. coli*. Estos nuevos serotipos de *Salmonella* deben ser considerados como un problema de salud global y no como problemas locales o regionales para combatir la resistencia a los antibióticos.

A nivel de la industria avícola es imprescindible tomar medidas estrictas de bioseguridad para limitar la propagación de estos serotipos de *S. Infantis* resistentes, o el ingreso de otro serotipo que pudiera establecerse en pollos de engorde. Además, se debe administrar antibióticos de forma prudente y responsable para reducir la probabilidad de desarrollar resistencia a los antimicrobianos. Asimismo, es necesario desarrollar un programa de vigilancia epidemiológica en las granjas avícolas para monitorear la propagación de los serotipos resistentes encontrados en el presente estudio y la aparición de nuevos serotipos de *Salmonella* spp., incluyendo serotipos resistentes, para tener un control de estos patógenos en una etapa temprana.

5. CONCLUSIONES

Se identificaron 5 serotipos de *S. Infantis* (71,4%, 5/7), 1 serotipo de *S. Mbandaka* (14,3%, 1/7) y 1 serotipo de *S. Schwarzengrund* (14,3%, 1/7) a partir de 7 (31,82%, 7/22) cepas de *Salmonella* spp. aisladas del contenido cecal de pollos de engorde en granjas avícolas de la Isla Santa Cruz del Archipiélago de Galápagos.

Se determinaron genes de resistencia *bla*CTX-M-65 en todos los serotipos de *S. Infantis* del grupo *bla*CTX-M-9 (80%, 4/5), *bla*TEM-1A y *bla*TEM-136 en 2 y 1 serotipos de *S. Infantis* del grupo *bla*TEM-1 (60%, 3/5) respectivamente, que presentaron un fenotipo resistente a los antibióticos β -lactámicos ampicilina, cefotaxima y ceftazidima.

Se identificaron 5 genotipos con similitud genética intraserotipo (*S. Infantis*) de 87,5%, lo que revela que son serotipos estrechamente relacionados; además la similitud genética entre serotipos (*S. Infantis*, *S. Mbandaka* y *S. Schwarzengrund*) < a 58,6% no demuestra relación genética.

En conclusión general, este estudio demuestra la presencia de 3 serotipos del género *Salmonella*, entre los cuales, un clon de *S. Infantis* con genes de resistencia *bla*CTX-M-65 y/o *bla*TEM-1A y *bla*TEM-136 se encontró diseminada en granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz del Archipiélago de Galápagos.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda considerar una cobertura total de granjas de pollos de engorde en el Archipiélago de Galápagos, tomando en cuenta puntos estratégicos de muestreo a lo largo de la cadena productiva para entender mejor la epidemiología de serotipos del género *Salmonella*.

Es necesario probar con un mayor número de antibióticos para conocer si se tratan de serotipos resistentes a otros antibióticos, en especial, con los de mayor uso en avicultura que pueden co-seleccionar genes de resistencia, como los encontrados en el presente estudio.

Realizar estudios en otros microorganismos considerando elementos genéticos móviles sería de mucha utilidad para entender la presencia, propagación y persistencia de un determinado gen de resistencia.

Se requiere desarrollar investigación que verifique la relación entre la resistencia antimicrobiana en *S. Infantis* presente en los pollos de engorde en Galápagos con los serotipos del género *Salmonella* resistentes a los antibióticos de Ecuador continental.

Estos hallazgos sugieren el desarrollo de un programa de vigilancia epidemiológica para estos serotipos del género *Salmonella* productores de β -lactamasas y usar de forma prudente cualquier clase de antibiótico para, de alguna manera, controlar la propagación de estos agentes resistentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of Infectious Diseases*. <http://doi.org/10.1038/146837a0>
- AGROCALIDAD, (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad de Agro), & MAGAP, (Ministerio de Agricultura Ganadería Acuicultura y Pesca). (2010). RESOLUCIÓN N° 047. Obtenido de http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/pdfs/InocuidadAlimentaria/RESOLUCION_047_AVICOLAS.pdf
- Ahmed, R., Soule, G., Demczuk, W. H., Clark, C., Khakhria, R., Ratnam, S., ... Rodgers, F. G. (2000). Epidemiologic typing of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2403–2406.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697–705. <http://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>
- Alcaine, S. D., Warnick, L. D., & Wiedmann, M. (2007). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 70(3). <http://doi.org/10.4315/0362-028X-70.3.780>
- Almeida, F., Pitondo-Silva, A., Oliveira, M. A., & Falcão, J. P. (2013). Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 145–151 Contents. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.004>
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., & Capita, R. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 281–287. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.011>
- Arlet, G., Barrett, T. J., Butaye, P., Cloeckert, A., Mulvey, M. R., & White, D. G. (2006). *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes and Infection*, 8(7). <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.029>
- Asai, T., Ishihara, K., Harada, K., Kojima, A., Tamura, Y., Sato, S., & Takahashi, T. (2007). Long-term prevalence of antimicrobial-resistant *Salmonella* enterica subspecies enterica Serovar infantis in the broiler chicken industry in Japan. *Microbiology and Immunology*, 51(1), 111–115.

- Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R., & Ishikawa, H. (2009). Relationships between multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund and both broiler chickens and retail chicken meats in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62(3), 198–200.
- Aviv, G., Rahav, G., & Gal-mor, O. (2016). Horizontal Transfer of the *Salmonella enterica* Serovar Infantis Resistance and Virulence Plasmid pESI to the Gut Microbiota of Warm-Blooded Hosts. *American Society for Microbiology*, 7(5). <http://doi.org/10.1128/mBio.01395-16>. Editor
- Bagattini, M. (2006). *Epidemiologia molecolare di Klebsiella pneumoniae produttore di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL) circolante in una Terapia Intensiva Neonatale*. (Tesis Doctoral). <http://doi.org/10.6092/UNINA/FEDOA/975>
- Baraniak, A., Fiett, J., Mrówka, A., Walory, J., Hryniewicz, W., & Gniadkowski, M. (2005). Evolution of TEM-type extended-spectrum β -lactamases in clinical *Enterobacteriaceae* strains in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1872–1880. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1872-1880.2005>
- Barbour, E. K., Ayyash, D. B., Alturkistni, W., Alyahiby, A., Yaghmoor, S., Iyer, A., ... Harakeh, S. (2015). Impact of sporadic reporting of poultry *Salmonella* serovars from selected developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(1), 1–7. <http://doi.org/10.3855/jidc.5065>
- Barrett, T. J., Gerner-Smidt, P., & Swaminathan, B. (2006). Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1). <http://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.20>
- Batz, M., Hoffmann, S., & Morris, J. G. (2014). Disease-Outcome Trees, EQ-5D Scores, and Estimated Annual Losses of Quality-Adjusted Life Years (QALYs) for 14 Foodborne Pathogens in the United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5). <http://doi.org/10.1089/fpd.2013.1658>
- Bauernfeind, A., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., Röhnisch, T., Schweighart, S., ... Goldberg, M. (1992). A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*, 20(3). <http://doi.org/10.1007/BF01704610>
- Bauernfeind, A., Schweighart, S., & Grimm, H. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18(5). <http://doi.org/10.1007/BF01647010>

- Bäumler, A. J., Hargis, B. M., & Tsois, R. M. (2000). Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science*, 287. <http://doi.org/10.1126/science.287.5450.50>
- Bebrone, C. (2007). Metallo β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 74(12), 1686–1701. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.05.021>
- Bonelli, R. R., Moreira, B. M., & Picão, R. C. (2014). Antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*, 17(1-2), 13. <http://doi.org/10.1016/j.drug.2014.02.001>
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agent Chemother*, 48(1), 1–14. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1>
- Bonomo, R. A. (2016). β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>
- Brolund, A., & Sandegren, L. (2016). Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infectious Diseases (London, England)*, 48(1). <http://doi.org/10.3109/23744235.2015.1062536>
- Brown, K., Uwiera, R. R., Kalmokoff, M. L., Brooks, S. P., & Inglis, G. D. (2016). Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 12–24. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <http://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Caffer, M. I., Terragno, R., & Binsztein, N. (2008). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. *Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia Del WHO Global Salmonella Surv. Para América Del Sur*, 1–76. Obtenido de http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_Salmonella_2008.pdf
- Cantón, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion*

- in Microbiology*, 9(5), 466–475. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>
- Cantón, R., Coque, T. M., & Baquero, F. (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16(4), 315–325. <http://doi.org/10.1097/01.qco.0000083566.48197.8b>
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <http://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Cartelle-Gestal, M., Zurita, J., Paz y Mino, A., Ortega-Paredes, D., & Alcocer, I. (2016). Characterization of a small outbreak of *Salmonella* enterica serovar Infantis that harbour CTX-M-65 in Ecuador. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(4). <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.03.007>
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). (2013a). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Current*. <http://doi.org/CS239559-B>
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). (2013b). Standard Operating Procedure for Pulsenet Pfg of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Non-O157 (Stec), *Salmonella* Serotypes, Shigella Sonneiand Shigella Flexneri. *Centers for Disease Control and Prevention*. Atlanta. Obtenido de http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). (2015). Salmonellosis (Non-typhoidal). *Yellow Book*. Obtenido de <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/salmonellosis-nontyphoidal>
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). (2016). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2014: Annual Report. *US Department of Health and Human Services*, pp. 1–19. Atlanta, Georgia. Obtenido de <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-outbreaks-annual-report-2014-508.pdf>
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). (2017). Multistate Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Linked to Live Poultry in Backyard Flocks (Eight, Final Update). Atlanta, GA, USA. Obtenido de <https://www.cdc.gov/Salmonella/live-poultry-05-16/>

- Chen, M., Hwang, W., Wang, S., Shih, Y., & Tsen, H. (2011). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis for multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolates collected in six years (2000 e 2005) from retail chicken meat in Taiwan. *Food Microbiology*, 28(3), 399–405. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.002>
- Chiaretto, G., Zavagnin, P., Bettini, F., Mancin, M., Minorello, C., Saccardin, C., & Ricci, A. (2008). Extended spectrum β -lactamase SHV-12-producing *Salmonella* from poultry. *Veterinary Microbiology*, 128(3-4), 406–413. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.016>
- Chiou, C. S., Huang, J. F., Tsai, L. H., Hsu, K. M., Liao, C. S., & Chang, H. L. (2006). A simple and low-cost paper-bridged method for *Salmonella* phase reversal. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54(4), 315–317. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.10.009>
- Chon, J.-W., Jung, H.-I., Kuk, M., Kim, Y.-J., Seo, K.-H., & Kim, S.-K. (2015). High occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* in broiler carcasses from poultry slaughterhouses in South Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(3). <http://doi.org/10.1089/fpd.2014.1847>
- Chuma, T., Miyasako, D., Dahshan, H., Takayama, T., Nakamoto, Y., Shahada, F., ... Okamoto, K. (2013). Chronological change of resistance to β -lactams in *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated from broilers in Japan. *Frontiers in Microbiology*, 4(21 MAY). <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00113>
- CloECKaert, A., & Chaslus-dancla, E. (2001). Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Veterinary Research*, 32(3-4), 291–300.
- CloECKaert, A., Praud, K., Doublet, B., Bertini, A., Carattoli, A., Butaye, P., ... Weill, F. X. (2007). Dissemination of an extended-spectrum- β -lactamase blaTEM-52 gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(5), 1872–1875. <http://doi.org/10.1128/AAC.01514-06>
- CLSI, (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012). *M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. CLSI document M07-A9 (Vol. 32)*. Wayne, Pennsylvania. <http://doi.org/10.4103/0976-237X.91790>

- CLSI, (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2015). M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, pp. 1–236. Wayne, Pennsylvania.
- CLSI, (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2017). M100-S27: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLSI Supplement M100*. Wayne, Pennsylvania.
- Cosby, D. E., Cox, N. A., Harrison, M. A., Wilson, J. L., Jeff Buhr, R., & Fedorka-Cray, P. J. (2015). *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 24, 408–426. <http://doi.org/10.3382/japr/pfv038>
- Crump, J. A., Medalla, F. M., Joyce, K. W., Krueger, A. L., Hoekstra, R. M., Whichard, J. M., & Barzilay, E. J. (2011). Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3). <http://doi.org/10.1128/AAC.01333-10>
- da Silva, K. C., & Lincopan, N. (2012). Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, 48(2), 91–99. <http://doi.org/10.1590/S1676-24442012000200004>
- da Silva-Nogueira, K., Daur, A. V., de Messias-Reason, I. T., Gales, A. C., & Dalla-Costa, L. M. (2011). Cefepime versus extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(2), 167–169.
- de Janon-González, D. S. (2016). *Determinación fenotípica de cepas de Escherichia coli resistente a betalactámicos, por la técnica de doble disco, en pollos faenados en seis camales industriales de la provincia de Pichincha*. (Tesis de grado). Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10230>
- Deem, S. L., Cruz, M. B., Higashiguchi, J. M., & Parker, P. G. (2012). Diseases of poultry and endemic birds in Galapagos: Implications for the reintroduction of native species. *Animal Conservation*, 15(1). <http://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2011.00489.x>
- DEFRA, (Departament for Environment Food and Rural Affairs). (2008). UK National Control Programme for *Salmonella* in chickens (*Gallus gallus*) reared for meat (Broilers). *Department for Environment, Food and Rural Affairs*. London:

Department for Environment, Food and Rural Affairs. Obtenido de https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/183080/Salmonella-broilers.pdf

- Didelot, X., & Falush, D. (2007). Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data, *175*(3), 1251–1266. <http://doi.org/10.1534/genetics.106.063305>
- Dionisi, A. M., Owczarek, S., Benedetti, I., Luzzi, I., & García-Fernández, A. (2016). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* enterica serovar Infantis from humans in Italy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *48*(3), 345–346. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.025>
- Djeffal, S., Bakour, S., Mamache, B., Elgroud, R., Agabou, A., Chabou, S., ... Rolain, J.-M. (2017). Prevalence and clonal relationship of ESBL- producing *Salmonella* strains from humans and poultry in northeastern Algeria. *BMC Veterinary Research*, *13*(1), 132. <http://doi.org/10.1186/s12917-017-1050-3>
- Doi, Y., Adams-Haduch, J. M., & Paterson, D. L. (2008). *Escherichia coli* isolate coproducing 16S rRNA methylase and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase isolated from an outpatient in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(3), 1204–1205. <http://doi.org/10.1128/AAC.01320-07>
- Doumith, M., Godbole, G., Ashton, P., Larkin, L., Dallman, T., Day, M., ... Woodford, N. (2016). Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella* enterica and *Escherichia coli* in England and Wales. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(8), Webb, H. E., Granier, S. A., Mrult, M., Millemann,. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw093>
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(SUPPL. 1), 90–103. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>
- Duarte, D. A. M., Ribeiro, A. R., Vasconcelos, A. M. M., Santos, S. B., Silva, J. V. D., Andrade, P. L. A. de, & Falcão, L. S. P. da C. de A. (2009). Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*(3), 569–573. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300020>
- EFSA, (European Food Safety Authority), & ECDC, (European Centre for Disease

- Prevention and Control). (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 4634. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329>
- EFSA, (European Food Safety Authority), & ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control). (2017). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal*, 15(2), 4694. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2598>.
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Hooi-Leng, S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <http://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Escandón-vargas, K., Reyes, S., Gutiérrez, S., & Villegas, M. V. (2017). The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 15(3), 277–297. <http://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>
- EUCAST, (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2015). Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method - Version 5.0. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 5.0(January).
- EUCAST, (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2017). Data from the EUCAST MIC distribution website. Obtenido de <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=16>
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., Heeg, P., ... Trautmann, M. (2017). Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, 1–24. <http://doi.org/10.3205/dgkh000290>
- Falush, D., Torpdahl, M., Didelot, X., Conrad, D. F., Wilson, D. J., & Achtman, M. (2006). Mismatch induced speciation in *Salmonella*: model and data. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1475), 2045–2053. <http://doi.org/10.1098/rstb.2006.1925>
- FAO, (Food and Agriculture Organization of the United Nations), WHO, (World Health

- Organization), & OIE, (World Organisation for Animal Health). (2011). *Reunión conjunta FAO/OMS/OIE de expertos sobre los antimicrobianos de importancia crítica*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/013/i0204s/i0204s00.pdf>
- FDA, (Food and Drug Administration), & NARMS, (National Antimicrobial Resistance Monitoring System). (2016). FDA Releases 2014 NARMS Integrated Report ; Finds Measurable Improvements in Antimicrobial Resistance Levels. Obtenido de <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm529719.htm>
- Feldgarden, M. (2010). Resistance in reservoirs and human commensals. In *Antimicrobial Resistance in Developing Countries* (pp. 267–282). New York.: Springer.
- Fernandes, S. A., Camargo, C. H., Francisco, G. R., Bueno, M. F. C., Garcia, D. O., Doi, Y., & Tiba Casas, M. R. (2016). Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamases CTX-M-8 and CTX-M-2-Producing *Salmonella* Serotypes from Clinical and Nonhuman Isolates in Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 23(5), 580–589. <http://doi.org/10.1089/mdr.2016.0085>
- Flockhart, L., Pintar, K., Cook, A., McEwen, S., Friendship, R., Kelton, D., & Pollari, F. (2016). Distribution of *Salmonella* in Humans, Production Animal Operations and a Watershed in a FoodNet Canada Sentinel Site. *Zoonoses and Public Health*, 64(1), 41–52. <http://doi.org/10.1111/zph.12281>
- Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(4), 272–288. <http://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x>
- Foley, S. L., Lynne, A. M., & Nayak, R. (2008). *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*, 86(14 Suppl), 149–162. <http://doi.org/10.2527/jas.2007-0464>
- Franco, A., Leekitcharoenphon, P., Feltrin, F., Alba, P., Cordaro, G., Iurescia, M., ... Battisti, A. (2015). Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *Salmonella* Infantis Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS ONE*, 10(12), e0144802. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0144802>

- Galanis, E., Lo Fo Wong, D. M. A., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., ... Wegener, H. C. (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 12(3), 318–188. <http://doi.org/10.3201/eid1205.050854>
- Galápagos Conservancy. (2017). Santa Cruz. Obtenido de https://www.galapagos.org/about_galapagos/about-galapagos/the-islands/santa-cruz/
- Gal-Mor, O., Valinsky, L., Weinberger, M., Guy, S., Jaffe, J., Schorr, Y. I., ... Nissan, I. (2010). Multidrug-resistant *Salmonella* enterica serovar Infantis, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, 16(11), 1754–1757. <http://doi.org/10.3201/eid1611.100100>
- Gast, R. K. (2007). Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne *Salmonella* in Poultry. *Avian Diseases*, 51(4), 817–828. <http://doi.org/10.1637/8090-081807.1>
- Gelinski, J., Bombassaro, A., Baratto, C., & Vicente, V. (2014). Resistance to Extended-Spectrum β -Lactamases in *Salmonella* from a Broiler Supply Chain. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 11718–11726. <http://doi.org/10.3390/ijerph111111718>
- Georgios, M., Egki, T., & Effrosyni, S. (2014). Phenotypic and Molecular Methods for the Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram Negative Nosocomial Pathogens. *Trends in Infectious Diseases*. <http://doi.org/10.5772/57582>
- Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2014). Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, 17, 11–22. Obtenido de [http://eprints.medilam.ac.ir/675/1/Extended Spectrum Beta-lactamases Definition, Classification and Epidemiology.pdf](http://eprints.medilam.ac.ir/675/1/Extended%20Spectrum%20Beta-lactamases%20Definition,%20Classification%20and%20Epidemiology.pdf)
- Gilchrist, M. J., Greko, C., Wallinga, D. B., Beran, G. W., Riley, D. G., & Thorne, P. S. (2007). The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, 115(2), 313–316. <http://doi.org/10.1289/ehp.8837>
- Giske, C. G., Martinez, L., Cantòn, R., Stefani, S., Skov, R., Glupczynski, Y., ... Gniadkowski, M. (2013). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and / or epidemiological

- importance. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, (December), 1–40.
- Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 866–875. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>
- Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2007). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 7th revision. *WHO Collaborating Centre For Reference and Research on Salmonella*. Obtenido de [http://www.scacm.org/free/Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars 2007 9th edition.pdf](http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf)
- Guerra, M. M. M., de Almeida, A. M., & Willingham, A. L. (2016). An overview of food safety and bacterial foodborne zoonoses in food production animals in the Caribbean region. *Tropical Animal Health and Production*, 48, 1095–1108. <http://doi.org/10.1007/s11250-016-1082-x>
- Hafez, H. M., & Hauck, R. (2015). Zoonoses with Public Health Relevance in Poultry. In A. Sing (Ed.), *Zoonoses—Infections Affecting Humans and Animals* (pp. 103–124). London: Springer-Science Business Media Dordrecht.
- Hall, B. G., & Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(6), 1050–1051. <http://doi.org/10.1093/jac/dki130>
- Hassan, A.-R. H. A., Salam, H. S. H., & Abdel-Latef, G. K. (2016). Serological identification and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from broiler carcasses and human stools in Beni-Suef, Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(2), 202–207. <http://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.04.002>
- Hauser, E., Tietze, E., Helmuth, R., Junker, E., Prager, R., Schroeter, A., ... Malorny, B. (2012). Clonal dissemination of *Salmonella* enterica serovar Infantis in Germany. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(4), 352–260. <http://doi.org/10.1089/fpd.2011.1038>
- Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D. M. a, Jensen, A. B.,

- Wegener, H. C., & Aarestrup, F. M. (2011). Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(8), 1–14. <http://doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>
- Hofer, E., Filho, S. J. d. S., & da Reis, E. M. F. (1997). Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 17(2), 55–62. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X1997000200003>.
- Hoffmann, S., Batz, M. B., & Morris Jr, J. G. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1292–1302. <http://doi.org/10.4315/0362-028X>.
- Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 1–12. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Hoszowski, A., Zając, M., Lalak, A., Przemys, P., & Wasyl, D. (2016). Fifteen years of successful spread of *Salmonella* enterica serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2), 237–241. <http://doi.org/10.5604/12321966.1203883>
- Hur, J., Jawale, C., & Lee, J. H. (2012). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*, 45(2), 819–830. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.014>
- Imen, B. S., Ridha, M., & Mahjoub, A. (2012). Laboratory typing methods for diagnostic of *Salmonella* strains, the “old” organism that continued challenges. In B. S. M. Mahmoud (Ed.), *Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen*. Rijeka, Croacia: InTech. Obtenido de <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/26435.pdf>
- ISO, (International Organization for Standardization). (2002). ISO 6579:2002/AMD 1 (E) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland. Obtenido de <http://www.sag.cl/sites/default/files/it-lab-26-v02.pdf>
- ISO, (International Organization for Standardization). (2007, July 15). 6579:2002/AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal

- faeces and in environmental samples from the primary production stage. *British Standard Institute*. Geneva, Switzerland. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- ISO, (International Organization for Standardization). (2014). ISO/TR 6579-3. Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for the detection , enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 3 Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp . *International Organization for Standardization*, 4(2), 1–31.
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., ... Weill, F. X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>
- Jacoby, G. A., Medeiros, A. A., O'Brein, T. F., Pinto, M. E., & Jiang, H. (1988). Broad-spectrum, transmissible β -lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 319(11), 723. <http://doi.org/10.1056/NEJM198809153191114>
- Jacoby, G. A., & Munoz-Prince, L. S. (2005). Mechanisms of Disease: The new β -Lactamases. *N. Engl. J. Med.*, 352(4), 380–391. <http://doi.org/10.1056/NEJMra041359>
- Jordan, K., & Walker, J. M. (2015). *Pulse Field Gel Electrophoresis. Métodos y protocolos*. (K. Jordan & M. Dalmasso, Eds.). London: Humana Press. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2599-5>
- Kahn, L. H. (2006). Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 256–261. <http://doi.org/10.3201/eid1204.050956>
- Kameyama, M., Chuma, T., Yokoi, T., Yabata, J., Tominaga, K., Miyasako, D., ... Okamoto, K. (2012). Emergence of *Salmonella* enterica Serovar Infantis Harboring Incl1 Plasmid with blaCTX-M-14 in a Broiler Farm in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(9), 1213–1216. <http://doi.org/10.1292/jvms.11-0488>
- Kanashiro, A., Stoppa, G., Cardoso, A., Tessari, E., & Castro, A. (2005). Serovars of *Salmonella* spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 7(3), 195 – 198. <http://doi.org/10.1590/S1516-635X2005000300010>

- Kingdom, U. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of, *95*(March), 3140–3145.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., & Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, *11*(6), 315–317. <http://doi.org/10.1007/BF01641355>
- Kuehn, B. M. (2014). FDA moves to curb antibiotic use in livestock. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, *311*(4), 347–348. <http://doi.org/10.1001/jama.2013.285704>
- Lai, J., Wu, C., Wu, C., Qi, J., Wang, Y., Wang, H., ... Shen, J. (2014). Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. *International Journal of Food Microbiology*, *180*(January), 30–38. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.030>
- Langridge, G. C., Wain, J., & Nair, S. (2012). Invasive Salmonellosis in Humans. *EcoSal Plus*, *5*(1), 1–14. <http://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.6.2.2>
- Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., ... Woodford, N. (2007). CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59*(2), 165–174. <http://doi.org/10.1093/jac/dkl483>
- Livermore, D. M., & Woodford, N. (2006). The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, *14*(9), 413–420. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.008>
- López-Velandia, D. P., Torres-Caycedo, M. I., & Prada-Quiroga, C. F. (2015). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Revista Universidad Y Salud*, *18*(1), 190–202.
- Madec, J., Haenni, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). ESBL/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? *Clinical Microbiology and Infection*, 1–23. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.013>
- Magwedere, K., Rauff, D., De Klerk, G., Keddy, K. H., & Dziva, F. (2015). Incidence of nontyphoidal *Salmonella* in food-producing animals, animal feed, and the associated environment in South Africa, 2012-2014. *Clinical Infectious Diseases*,

- 61(Suppl 4), S283–S289. <http://doi.org/10.1093/cid/civ663>
- Majiduddin, F. K., Materon, I. C., & Palzkill, T. G. (2002). Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 292(2), 127–137. <http://doi.org/10.1078/1438-4221-00198>
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., ... Hoekstra, R. M. (2010). The Global Burden of Nontyphoidal Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882–889. <http://doi.org/10.1086/650733>
- Mamza, S. A., & Msheila, G. (2016). Beta-lactamases and their Global Health Implications—One: Epidemiological Profile, Paradigm of Nigerian Chickens *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Etiology Animal Health*, 2(1), 1–10.
- Marin, C., Hernandez, A., & Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88(2), 424–431. <http://doi.org/10.3382/ps.2008-00241>
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. <http://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- McDermott, P. F., Tyson, G. H., Kabera, C., Chen, Y., Li, C., Folster, J. P., ... Zhao, S. (2016). The use of whole genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(9), 5515–5520. <http://doi.org/10.1128/AAC.01030-16>
- Mead, G., Lammerding, A. M., Cox, N., Doyle, M. P., Humbert, F., Kulikovskiy, A., & Wierup, M. (2010). Scientific and Technical Factors Affecting the Setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1566–1590. <http://doi.org/10.4315/0362-028X-73.8.1566>
- Meakins, S., Fisher, I. S. T., Berghold, C., Gerner-Smidt, P., Tschape, H., Cormican, M., ... Threlfall, E. J. (2008). Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microbial Drug Resistance*, 14(1), 31–35.

<http://doi.org/10.1089/mdr.2008.0777>

- Michael, G. B., Butaye, P., Cloeckaert, A., & Schwarz, S. (2006). Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes and Infection*, 8(7), 1898–1914. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.019>
- Miller, T., Braun, P. G., Fehlhaber, K., Prager, R., Pfeifer, Y., & Rabsch, W. (2014). Typing of *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from 51 outbreaks in Germany between 1974 and 2009 by a novel phage-typing scheme. *Epidemiology and Infection*, 142(1), 75–83. <http://doi.org/10.1017/S095026881300037X>
- Minarini, L. A. R., Gales, A. C., Palazzo, I. C. V., & Darini, A. L. C. (2007). Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum b-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Current Microbiology*, 54(5), 335–341. <http://doi.org/10.1007/s00284-006-0307-z>
- Montville, T. J., & Mathews, K. R. (2008). Gram-Negative Foodborne Pathogenic Bacteria. In *Food Microbiology: An Introduction* (2nd ed.). Washington DC, USA: ASM Press.
- Moore, P. R., Evenson, A., Luckey, T. D., McCoy, E., Elvehjem, C. A., & Hart, E. B. (1946). Use of sulfasuxidine, streptothricin and streptomycin in nutritional studies with the chick. *Journal of Biological Chemistry*, 165, 437–441.
- Moraes, D. M. C., Andrade, M. A., Duarte, S. C., Bastos, T. S. A., Arnhold, E., Jayme, V. de S., & Nunes, I. A. (2016). Phenotypic and molecular detection of *Salmonella* sp. on growing, rearing and production phases in a commercial group of laying hens. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(6), 503–508. <http://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000600007>
- Morris, J. G., & Potter, M. E. (Eds.). (2013). *Foodborne Infections and Intoxications. Journal of Chemical Information and Modeling* (4th ed., Vol. 53). Waltham, USA: Academic Press. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Moxley, R. (2013). *Enterobacteriaceae: Salmonella*. In D. S. McVey, M. Kennedy, & M. M. Chengappa (Eds.), *Veterinary Microbiology* (3rd ed., Vol. 140, p. 629). Manhattan, Kansas: Wiley-Blackwell. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.024>
- MSP, (Ministerio de Salud Pública). (2016). Gaceta Epidemiológica Semanal No. 53. Obtenido de <http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/gaceta/GACETA>

- Nguyen, D. T. A., Kanki, M., Nguyen, P. Do, Le, H. T., Ngo, P. T., Tran, D. N. M., ... Yamamoto, Y. (2016). Prevalence, Antibiotic Resistance, and Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamase Productivity of *Salmonella* Isolates from Raw Meat and Seafood Samples in Ho Chi Minh City, Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 115–122. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.017>
- NOAH, (National Office of Animal Health). (2016). Critically Important Antibiotics in Veterinary Medicine : European Medicines Agency Recommendations. Obtenido de <http://www.noah.co.uk/wp-content/uploads/2016/12/NOAH-briefing-on-CIAs-07122016.pdf>
- Noda, T., Murakami, K., Etoh, Y., Okamoto, F., Yatsuyanagi, J., Sera, N., ... Fujimoto, S. (2015). Increase in Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in *Salmonella* Isolated from Retail Chicken Products in Japan. *PLOS ONE*, 10(2), e0116927. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0116927>
- Noda, T., Murakami, K., Ishiguro, Y., & Asai, T. (2010). Chicken meat is an infection source of *Salmonella* serovar Infantis for humans in Japan. *Foodborne Pathog Dis*, 7(6), 727–735. <http://doi.org/10.1089/fpd.2009.0438>
- Nogales, H., & Andrade, D. (2013). Guía de Buenas Prácticas Avícolas. RESOLUCIÓN TÉCNICA N° 0017. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2015/07/GUIA-AVICOLA1.pdf>
- Nógrády, N., Király, M., Davies, R., & Nagy, B. (2012). Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 108–112. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.007>
- Novais, A., Canto, R., Machado, E., Gala, J., Carattoli, A., Baquero, F., & Coque, T. M. (2006). Dissemination and Persistence of blaCTX-M-9 Are Linked to Class 1 Integrons Containing CR1 Associated with Defective Transposon Derivatives from Tn 402 Located in Early Antibiotic Resistance Plasmids of IncHI2, IncP1- α , and IncFI Groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), 2741–2750. <http://doi.org/10.1128/AAC.00274-06>
- Nyabundi, D., Onkoba, N., Kimathi, R., Nyachio, A., Juma, G., Kinyanjui, P., & Kamau, J. (2017). Molecular characterization and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* isolated from fecal matter of domestic animals and animal products in Nairobi.

- Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, 3(2), 1–7.
<http://doi.org/10.1186/s40794-016-0045-6>
- Odumeru, J. A., & León-Velarde, C. G. (2012). *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients. In B. S. M. Mahmoud (Ed.), *In Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen* (1st ed., pp. 373–392). Rijeka, Croacia: InTech.
<http://doi.org/10.5772/52807>
- Olesen, I., Hasman, H., & Aarestrup, F. M. (2004). Prevalence of B-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 10(4), 334–340.
<http://doi.org/10.1089/mdr.2004.10.334>
- Olliver, A., Vallé, M., Chaslus-Dancla, E., & Cloeckert, A. (2005). Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 289–301.
<http://doi.org/10.1128/AAC.49.1.289-301.2005>
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92.
- Ortega-Paredes, D., Barba, P., & Zurita, J. (2016). Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiology and Infection*, 144(14), 2967–2970. <http://doi.org/10.1017/S0950268816001369>
- Park, K. S., Lee, J. H., Park, M., Ko, K. S., & Lee, S. H. (2017). How many *mcr-1*-harbouring bacteria were spreading geographically? *Biomedical Research (India)*, 28(4), 1659–1663.
- Paterson, D. L., & Harris, P. N. A. (2016). Colistin resistance: A major breach in our last line of defence. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 132–133.
[http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00463-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00463-6)
- Patterson, J. E. (2003). Extended-spectrum Beta-lactamases. *In Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 24(1), 79–87.
<http://doi.org/10.1097/INF.0b013e31823c0e9d>
- Paulson, J. A., & Zaoutis, T. E. (2015). Nontherapeutic Use of Antimicrobial Agents in

- Animal Agriculture: Implications for Pediatrics. *Pediatrics*, 136(6), 1671–1677. <http://doi.org/10.1542/peds.2015-3630>
- Philippon, A., Slama, P., & Labia, R. (2016). A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clinical Microbiol Reviews*, 29(1), 29–57. <http://doi.org/10.1128/CMR.00019-15>.Address
- Pires, S. M., Vieira, A. R., Hald, T., & Cole, D. (2014). Source Attribution of Human Salmonellosis: An Overview of Methods and Estimates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 0(0), 1–10. <http://doi.org/10.1089/fpd.2014.1744>
- Pires, S. M., Vieira, A. R., Perez, E., Wong, D. L. F., & Hald, T. (2012). Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 131–138. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.018>
- Poppe, C., Irwin, R. J., Forsberg, C. M., Clarke, R. C., & Oggel, J. (1991). The prevalence of *Salmonella* enteritidis and other *Salmonella* sp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. *Epidemiology and Infection*, 107(1), 201–211. <http://doi.org/10.1017/S0950268800048822>
- Poulou, A., Grivakou, E., Vrioni, G., Koumaki, V., Pittaras, T., Pournaras, S., & Tsakris, A. (2014). Modified CLSI Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Confirmatory Test for Phenotypic Detection of ESBLs among *Enterobacteriaceae* Producing Various β -Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1483–1489. <http://doi.org/10.1128/JCM.03361-13>
- Prescott, J. F. (2013). Antimicrobial Chemotherapy. In & M. M. C. D. S. McVey, M. Kennedy (Ed.), *Veterinary Microbiology* (3rd ed., pp. 26–44). Wiley-Blackwell. <http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.024>
- Rabsch, W., Hargis, B. M., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Hinz, K. H., Tschäpe, H., & Bäumlner, A. J. (2000). Competitive exclusion of *Salmonella* enteritidis by *Salmonella* gallinarum in poultry. *Emerging Infectious Diseases*, 6(5), 443–8. <http://doi.org/10.3201/eid0605.000501>
- Rabsch, W., Simon, S., & Humphrey, T. (2013). Public health aspects of *Salmonella* infections. In P. Barrow & U. Methner (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals* (2nd ed., pp. 351–376). London, UK: Wallingford: CAB International.

- Radice, M., Power, P., & Conza, J. Di. (2002). Early Dissemination of CTX-M-Derived Enzymes in South America Early Dissemination of CTX-M-Derived Enzymes in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 602–604. <http://doi.org/10.1128/AAC.46.2.602>
- Rao, L., Lv, L., Zeng, Z., Chen, S., He, D., Chen, X., ... Liu, J. H. (2014). Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003-2012. *Veterinary Microbiology*, 172(3-4), 534–541. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.013>
- Ribot, E. M., Fair, M. a, Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 59–67. <http://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>
- Riccobono, E., Pilato, V. Di, Maggio, T. Di, Revollo, C., Bartoloni, A., Pallecchi, L., & Rossolini, G. M. (2015). Characterization of IncI1 sequence type 71 epidemic plasmid lineage responsible for the recent dissemination of CTX-M-65 extended-spectrum β -lactamase in the Bolivian Chaco Region. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5340–5347. <http://doi.org/10.1128/AAC.00589-15>
- Rupp, M. E., & Fey, P. D. (2003). Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* - Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, 63(4), 353–365. <http://doi.org/10.2165/00003495-200363040-00002>
- Sakano, C., Kuroda, M., Sekizuka, T., Ishioka, T., Morita, Y., Ryo, A., ... Kimura, H. (2013). Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *S. enterica* Serovar infantis isolates in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 328–330. <http://doi.org/10.1128/JCM.02225-12>
- Sánchez-Chugchilán, X. M. (2016). *Identificación molecular de Salmonella spp., en un sistema integrado de producción de pollos de engorde*. (Tesis de pregrado). Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11765>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <http://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

- Saravanan, S., Purushothaman, V., Murthy, T. R. G. K., Sukumar, K., Srinivasan, P., Gowthaman, V., ... Kuchipudi, S. V. (2015). Molecular Epidemiology of Nontyphoidal *Salmonella* in Poultry and Poultry Products in India: Implications for Human Health. *Indian Journal of Microbiology*, 55(3), 319–326. <http://doi.org/10.1007/s12088-015-0530-z>
- Schwarz, S., & Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32(3-4), 201–225. <http://doi.org/10.1051/vetres:2001120>
- Shah, D. H., Paul, N. C., Sisco, W. C., Crespo, R., & Guard, J. (2016). Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. *Poultry Science*, 96(3), 687–702. <http://doi.org/10.3382/ps/pew342>
- Shahada, F., Chuma, T., Dahshan, H., Akiba, M., Sueyoshi, M., & Okamoto, K. (2010). Detection and Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase (TEM-52)-Producing *Salmonella* Serotype Infantis from Broilers in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5), 515–521. <http://doi.org/10.1089=fpd.2009.0454>
- Shahada, F., Chuma, T., Tobata, T., Okamoto, K., Sueyoshi, M., & Takase, K. (2006). Molecular epidemiology of antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar Infantis from poultry in Kagoshima, Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(4), 302–7. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.07.003>
- Shahada, F., Sugiyama, H., Chuma, T., Sueyoshi, M., & Okamoto, K. (2010). Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of beta-lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. *Veterinary Microbiology*, 140(1-2), 136–41. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.007>
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 90–101. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
- Shivaprasad, H. L., Methner, U., & Barrow, P. A. (2013). *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In P. A. Barrow & U. Methner (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (2nd ed., pp. 162–192). London, UK: CAB International.
- Silva, K. C., Fontes, L. C., Moreno, A. M., Astolfi-Ferreira, C. S., Ferreira, A. J., &

- Lincopan, N. (2013). Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase CTX-M-2-producing *Salmonella* enterica serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(7), 3458–3459. <http://doi.org/10.1128/AAC.05992-11>
- Soos, C., Padilla, L., Iglesias, A., Gottdenker, N., Cruz Bendon, M., Rios, A., & Parker, P. G. (2008). Comparison of Pathogens in Broiler and Backyard Chickens on the Galápagos Islands: Implications for Transmission To Wildlife. *American Ornithologists' Union*, 125(2), 445–455. <http://doi.org/10.1525/auk.2008.06235>
- Spelberg, B., Hansen, G. R., Kar, A., Cordova, C. D., Price, L. B., & Johnson, J. R. (2016). Antibiotic Resistance in Humans and Animals. *National Academy of Medicine*. Obtenido de <https://nam.edu/antibiotic-resistance-in-humans-and-animals/>
- Sterzenbach, T., Crawford, R. W., Winter, S. E., & Bäumler, A. J. (2013). *Salmonella* Virulence Mechanisms and their Genetic Basis. In P. A. Barrow & U. Methner (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (2nd ed., pp. 80–103). London, UK: CAB International.
- Su, L.-H., & Chiu, C.-H. (2006). *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, 30(3), 210–219. <http://doi.org/3003/300302> [pii]
- Szmolka, A., Szabó, M., Kiss, J., Pászti, J., Adrián, E., Olasz, F., & Nagy, B. (2017). Molecular epidemiology of the endemic multiresistance plasmid pSI54/04 of *Salmonella* Infantis in broiler and human population in Hungary. *Food Microbiology*, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.011>
- Taguchi, M., Seto, K., Yamazaki, W., Tsukamoto, T., Izumiya, H., & Watanabe, H. (2006). CMY-2 beta -lactamase-producing *Salmonella* enterica serovar infantis isolated from poultry in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59(2), 144–146. Obtenido de <http://www.nih.go.jp/nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb>.
- Tate, H., Folster, J. P., Hsu, C. H., Chen, J., Hoffmann, M., Li, C., ... Zhao, S. (2017). Comparative Analysis of Extended Spectrum Beta-Lactamase CTX-M-65-Producing *Salmonella* Infantis Isolates from Humans, Food Animals, and Retail Chickens in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (8 May), 1–24. <http://doi.org/10.1128/AAC.00488-17>

- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239. <http://doi.org/0095-1137/>
- Torpdahl, M., & Ahrens, P. (2004). Population structure of *Salmonella* investigated by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 566–573. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02337.x>
- Trujillo, S., Keys, C. E., & Brown, E. W. (2011). Evaluation of the taxonomic utility of six-enzyme pulsed-field gel electrophoresis in reconstructing *Salmonella* subspecies phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(1), 92–102. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.10.004>
- Trung, N. V, Carrique-Mas, J. J., Nghia, N. H., Tu, L. T. P., Mai, H. H., Tuyen, H. T., ... Schultz, C. (2016). Non-Typhoidal *Salmonella* Colonization in Chickens and Humans in the Mekong Delta of Vietnam. *Zoonoses and Public Health*, (September 22), 1–6. <http://doi.org/10.1111/zph.12270>
- Tzouvelekis, L. S., Tzelepi, E., Tassios, P. T., & Legakis, N. J. (2000). CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(2), 137–142. [http://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00165-X](http://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00165-X)
- Villagómez-Estrada, S., Logacho-Pilatáxi, M., & Vinueza-Burgos, C. (2017). Presencia y Resistencia a los Antimicrobianos de serovariedades de *Salmonella* enterica aisladas en una empresa avícola integrada del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina Y Ciencias Biológicas*.
- Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Cisneros, M., & De Zutter, L. (2017). Important foodborne bacteria and their antimicrobial resistances in Ecuadorian poultry.pdf. <http://doi.org/DOI: 10.1111/tmi.12979>
- Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Ron-Garrido, L., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2016). Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter Age. *Plos One*, 11(7), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>
- Voss-Rech, D., Potter, L., Vaz, C. S. L., Pereira, D. I. B., Sangioni, L. A., Vargas, Á. C., & Botton, S. de A. (2016). Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella* Isolated from Human and Poultry-Related Samples in Brazil: 20-Year Meta-

- Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*, XX(XX), 1–9. <http://doi.org/10.1089/fpd.2016.2228>
- Voss-Rech, D., Vaz, C. S. L., Alves, L., Coldebella, A., Leao, J. A., Rodrigues, D. P., & Back, A. (2015). A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry Science*, 94(3), 1–9. <http://doi.org/10.3382/ps/peu081>
- Wagenaar, J. A., Hendriksen, R. S., & Carrique-Mas, J. (2013). Practical considerations of surveillance of *Salmonella* serovars other than Enteritidis and Practical considerations of surveillance of *Salmonella* serovars other than Enteritidis and Typhimurium. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 32(2), 509–519.
- Wain, J., & Olsen, J. E. (2013). Current and New Approaches to Typing of *Salmonella*. In P. A. Barrow & U. Methner (Eds.), *Salmonella in domestic animals* (2nd ed., pp. 498–517). London, UK: CAB International.
- Wattiau, P., Boland, C., & Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. Enterica Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7877–7885. <http://doi.org/10.1128/AEM.05527-11>
- Webb, H. E., Granier, S. A., Mrult, M., Milleman, Y., Bakker, H. C. den, Nightingale, K. K., ... Loneragan, G. H. (2016). Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 144–145. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00063-3](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00063-3)
- WHO, (World Health Organization). (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.009>
- WHO, (World Health Organization). (2017). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine-5th Revision 2016* (5th ed.). Geneva, Switzerland. Obtenido de <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255027/1/9789241512220-eng.pdf?ua=1>
- Winokur, P. L., Canton, R., Casellas, J. M., & Legakis, N. (2001). Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clinical Infectious Diseases*, 32(Supplement 2), S94–S103. <http://doi.org/10.1086/320182>

- Worrcman-Barninka, D., Destro, M. T., Fernandes, S. A., & Landgraf, M. (2001). Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiladis medium (MSRV) for the detection of *Salmonella* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, *64*(3), 387–393. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00484-](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00484-)
- Yamatogi, R. S., Oliveira, H. C., Possebon, F. S., Pantoja, J. C. F., Joaquim, J. G. F., Pinto, J. P. A. N., & Jr., J. P. A. (2016). Qualitative and Quantitative Determination and Resistance Patterns of *Salmonella* from Poultry Carcasses, *79*(6), 950–955. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-489>
- Yang, B., Qiao, L., Zhang, X., Cui, Y., Xia, X., Cui, S., ... Meng, J. (2013). Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. *Food Control*, *32*(1), 228–235. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.022>
- Yuan, L., Liu, J.-H., Hu, G.-Z., Pan, Y.-S., Liu, Z.-M., Mo, J., & Wei, Y.-J. (2009). Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China. *Journal of Medical Microbiology*, *58*(11), 1449–1453. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.012229-0>
- Zadernowska, A., & Chajęcka, W. (2012). Detection of *Salmonella* spp. presence in food. In B. S. M. Mahmoud (Ed.), *In Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen* (pp. 393–411). Rijeka, Croacia: InTech. <http://doi.org/10.5772/52807>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., ... Larsen, M. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*, 2640–2644. <http://doi.org/doi:10.1093/jac/dks261>
- Zhao, W., Hu, Z., Zhao, W., & Hu, Z. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended- spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria pidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *39*(1), 79–101. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>
- Ziech, R. E., Lampugnani, C., Perin, A. P., Sereno, M. J., Sfaciotte, R. A. P., Viana, C., ... dos Santos Bersot, L. (2016). Multidrug resistance and ESBL-producing *Salmonella* spp. isolated from broiler processing plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(1), 191–195. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.021>

ANEXOS

ANEXO A. Registro de muestreo – *Salmonella*

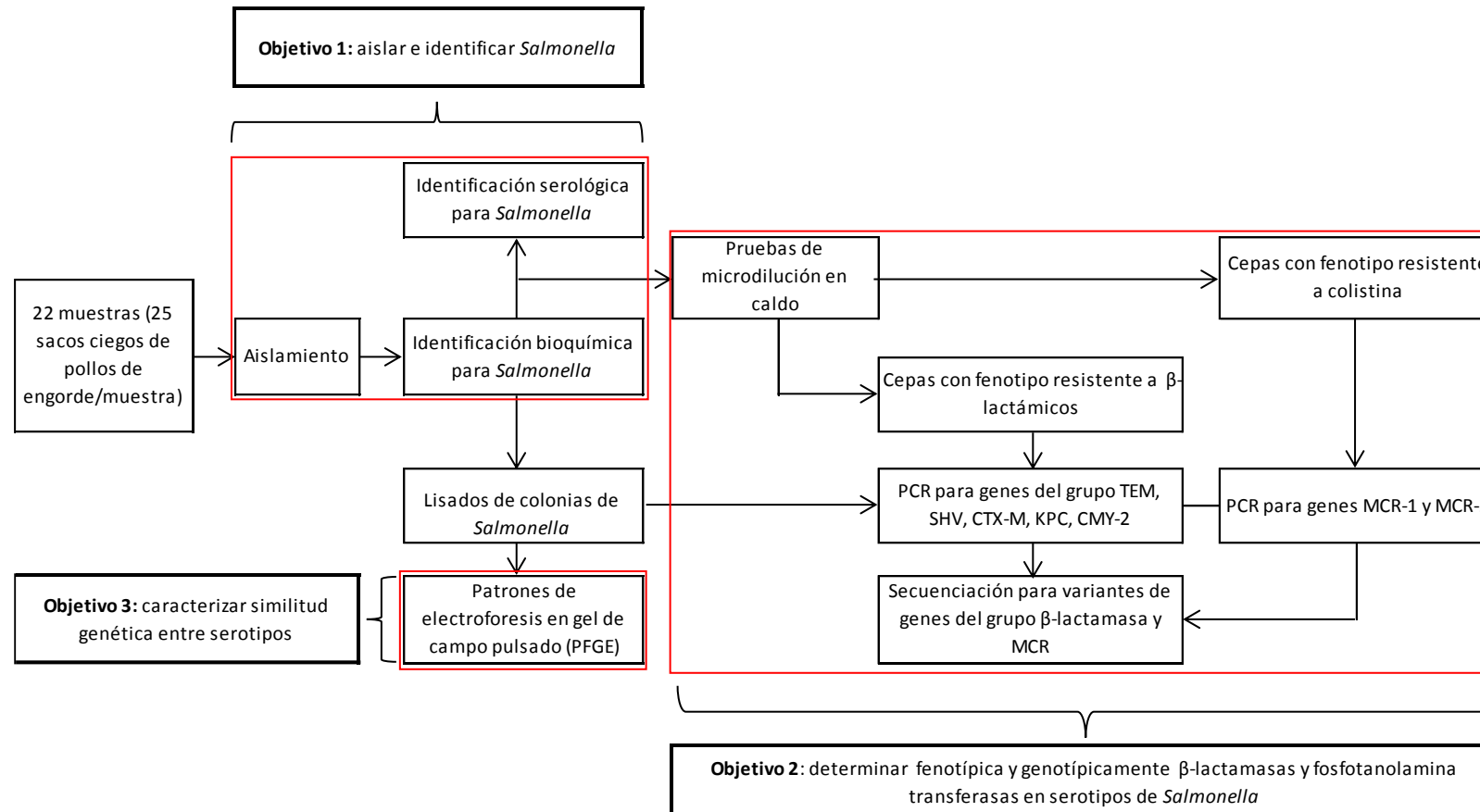
<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS Y RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS (UNIETAR) REGISTRO DE MUESTREO - <i>Salmonella</i></p>														
Proyecto: Bacterias transmitidas por alimentos en granjas avícolas de las Islas Galápagos.														
Provincia: Galápagos										Encuestador:				
Cantón: Santa Cruz										Fecha: 29 / febrero / 2016 al 26 / abril / 2016				
No.	Código	Fecha	Hora	INFORMACIÓN DE LA PARVADA			PROCEDENCIA						TIPO DE MUESTRA	Observaciones
				Tipo de ave	Edad (semanas)	Sexo	UBICACIÓN		GRANJA					
							Parroquia	Sector	Nombre	No. Gal	Gal/Gran	A/Gran		
1	G1A	29/02/2016	18:00	Broiler	6	Mixto	Santa Rosa	Conf.	Conf.	1	2	4830	SC	25 SC
2	G2A	29/02/2016	15:00	Broiler	6	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	1	2	7000	SC	25 SC
3	G3A	02/03/2016	6:00	Broiler	6	Mixto	Santa Rosa	Conf.	Conf.	2	2	5000	SC	25 SC
4	G4A	03/03/2016	8:00	Broiler	6	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	2	4	2096	SC	25 SC
5	G5A	03/03/2016	6:15	Broiler	6	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	3	3	1899	SC	25 SC
6	G6A	02/03/2016	16:00	Broiler	6	Mixto	Santa Rosa	Conf.	Conf.	1	2	1560	SC	25 SC
7	G7A	04/03/2016	6:00	Broiler	5	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	1	2	2200	SC	25 SC
8	G8A	03/03/2016	11:30	Broiler	6	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	3	2	1266	SC	25 SC
9	G9A	03/03/2016	11:00	Broiler	6	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	2	4	7553	SC	25 SC
10	G10A	07/03/2016	19:00	Broiler	6	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	5	6	9720	SC	25 SC
11	G11A	08/03/2016	6:00	Broiler	5	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	1	4	2000	SC	25 SC

ANEXO A (Continuación)

12	G12A	15/03/2016	12:00	Broiler	4	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	1	1	3894	SC	25 SC
13	G13A	15/03/2016	17:00	Broiler	4	Mixto	Santa Rosa	Conf.	Conf.	1	2	4770	SC	25 SC
14	G14A	15/03/2016	18:30	Broiler	3	Mixto	ND	Conf.	Conf.	2	ND	ND	SC	25 SC
15	G15A	16/03/2016	8:00	Broiler	4	Mixto	Santa Rosa	Conf.	Conf.	1	3	3980	SC	25 SC
16	G16A	17/03/2016	10:00	Broiler	5	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	1	4	6767	SC	25 SC
17	G17A	18/03/2016	2:00	Broiler	4	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	2	2	2558	SC	25 SC
18	G18A	30/03/2016	6:20	Broiler	6	Mixto	Santa Rosa	Conf.	Conf.	1	3	1480	SC	25 SC
19	G19A	30/03/2016	8:00	Broiler	3	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	1	4	6459	SC	25 SC
20	G20A	11/04/2016	7:00	Broiler	6	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	1	2	1900	SC	25 SC
21	G21A	11/04/2016	5:00	Broiler	6	Mixto	ND	Conf.	Conf.	2	ND	ND	SC	25 SC
22	G22A	26/04/2016	11:00	Broiler	6	Mixto	Bellavista	Conf.	Conf.	2	3	1876	SC	25 SC

Nota. Código = código de la Unidad de Investigación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Resistencia a los Antimicrobianas (UNIETAR) UNIETAR; No.Gal = número de galpón muestreado; Gal/Gran = número de galpones por granja; A/Gran = animales por granja; SC/Z = sacos ciego y/o zapatones; Conf. = confidencial; ND = no hay dato.

ANEXO B. Diagrama para procedimiento de la investigación



ANEXO C. Método de aislamiento para *Salmonella* spp. móviles en contenido cecal

MATERIALES

Equipos y Materiales

- Asa de nicrom de aro y asa de punta (o desechables)
- Autoclave
- Cajas Petri plásticas desechables estériles. Tamaño (90 a 100mm de diámetro)
- Estufa de cultivo $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Estufa de cultivo $41.5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Frascos Schott
- Matraz de erlenmeyer
- Pipetas bacteriológicas desechables de 10 ml
- Puntas desechable de 100 μl
- Tubos de ensayo de 10ml

Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agar hierro lisina (LIA)
- Agar triple azúcar hierro (TSI)
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- Agua peptonada bufferada (BPW)
- Caldo tripticasa soya (TSB)
- Caldo urea
- Medio semisólido Rappaport Vassiliadis (MSRV) modificado
- Sulfuro indol movilidad (SIM)

PROTOCOLO

Preparación de la muestra

- Sumergir los ciegos colectados en un vaso de precipitación con alcohol al 70% por cinco minutos, extender los ciegos sobre una funda estéril para eliminar el exceso de alcohol.
- Tomar un gramo de contenido cecal de cada ciego hasta llegar a 25 g en una funda estéril y homogeneizar manualmente por 2 minutos.

Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

- Precalentar el agua peptonada bufferada (BPW) a temperatura ambiente antes de su uso.
- Añadir una cantidad de la muestra a una cantidad de BPW estéril para producir una dilución 1:10 (por ejemplo, añadir 25 g de muestra a 225 ml de BPW) y homogeneizar durante 2 min e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 18 a 24 h. Sin embargo, para algún tipo de muestras puede ser necesario usar otra proporción.

Enriquecimiento selectivo en medio semisólido

- Dejar que las placas del medio semisólido Rappaport Vassiliadis (MSRV) modificado se equilibren a temperatura ambiente si se almacenan a una temperatura más baja.
- Inocular las cajas de MSRV con 3 gotas de cultivo de BPW incubado.

Nota: Las 3 gotas deben totalizar 100 μ l y deben colocarse por separado e igualmente espaciadas en la superficie del medio. Las fundas con sub-cultivo de BPW deben ser movidas con cuidado, y no mezclarlos, sacudirlos o girarlos para extraer un inóculo del mayor volumen de fluido libre más cercano a la interfaz entre el recipiente y la superficie del cultivo, pero es aconsejable profundizar si hay partículas flotando en la superficie.

- Incubar las placas MSR/V inoculadas a $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.
- Leer sin invertir las cajas. Las placas positivas mostrarán una zona turbia gris-blanca que se extiende desde la gota inoculada. La zona turbia se caracteriza por un halo gris-blanco con un borde claramente definido por las cepas móviles de *Salmonella*.

Nota: Si las placas son negativas después de 24 h, volver a incubar durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ adicionales.

Siembra en agar selectivo

- Permitir que las placas de xilosa lisina desoxicolato agar (XLD) se equilibren a temperatura ambiente si se almacenan a una temperatura más baja. Si es necesario, seque la superficie de las placas antes de usarlas.
- Observar la caja MSR/V positiva (si es necesario en una superficie blanca clara o caja de luz). Determinar dónde está el punto más distante de propagación del crecimiento opaco desde los puntos de inoculación y sumergir el asa de 1 μ l justo dentro del borde del crecimiento opaco. Retirar el asa asegurando que no se extraiga algo del MSR/V.
- Inocular la superficie de una placa XLD por el método de estriación para obtener colonias bien aisladas.
- Incubar las placas XLD invertidas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.
- Las colonias típicas de *Salmonella* cultivadas en agar XLD tienen un centro negro debido a la producción de sulfuro de hidrógeno y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador.

Nota: Las variantes de *Salmonella* spp. negativas a H_2S (por ejemplo, *Salmonella* Paratyphi A) cultivadas en agar XLD son rosadas con un centro rosado más oscuro. Las *Salmonellas* positivas a la lactosa cultivadas en agar XLD son amarillas con o sin ennegrecimiento.

Pruebas Bioquímicas

- Seleccionar una colonia típica de *Salmonella* spp. para realizar la confirmación bioquímica.
- Inocular en los agares diferenciales del triple azúcar hierro (TSI), picadura/superficial; lisina hierro agar (LIA), picadura/superficial; sulfuro indol movilidad (SIM), picadura y caldo urea.
- Incubar todos los medios de la batería bioquímica a $37^\circ\text{C} \pm$ por $24 \text{ h} \pm 3$.
- **Interpretar las reacciones bioquímicas:**
- ✓ **TSI:** considerar para la interpretación el medio K (alcalino) de color rojo y el medio A (ácido) de color amarillo. a) pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa. b) pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. c) pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el

microorganismo es no fermentador de azúcares. d) la presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas (G) y e) el ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce sulfuro de hidrógeno (H₂S).

- ✓ **LIA:** 1) decarboxilación de la lisina: a) prueba positiva: pico violeta/fondo violeta (K/K). b) prueba negativa: pico violeta/fondo amarillo. 2) Desaminación de la lisina: Pico rojizo/fondo amarillo. Esto sucede con cepas del género *Proteus*, *Providencia* y alguna cepas de *Morganella* spp. 3) Producción de sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico (H₂S): a) prueba positiva: ennegrecimiento del medio (especialmente en el límite del pico y fondo).
- ✓ **SIM:** a) cepas móviles: producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra. b) cepas inmóviles: el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra. c) cepas H₂S positivas: ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio. d) cepas H₂S negativas: el medio permanece sin cambio de color. e) Cepas indol positivas: anillo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's o de Erlich. f) cepas indol negativas: sin cambio de color.
- ✓ **Urea:** degradación de la urea: a) prueba positiva: se alcaliniza el medio por el cual el rojo fenol vira a un color rojo cereza. b) prueba negativa: no se encuentra la enzima ureasa para catalizar la urea y formar amoniaco y carbonato de amonio para alcalinizar el medio.

Respaldo de cepas

- Respaldo las cepas positivas a *Salmonella* spp. confirmadas por pruebas bioquímicas en un tubo eppendorf con 300 µl de caldo tripticasa soya (TSB). Incubar a 37°C por 24 h y al día siguiente colocar 600 µl de glicerol y congelar a -80°C.

ANEXO D. Método de serotipificación para *Salmonella*

MATERIALES

Equipos y Materiales

- Asas desechable de 1 µl
- Autoclave
- Baño María a 50 ± 2°C
- Bisturí
- Densimat
- Estufa de cultivo a 37 ± 1°C
- Frascos Schott
- Gradillas
- Matraz de erlenmeyer
- Mechero
- Cajas de Petri plásticas desechables estériles. Tamaño pequeño (90 a 100 mm de diámetro)
- Palillos de madera
- Papel filtro
- Porta objetos
- Tubos de 12 x 75 mm
- Tubos de ensayo de 10 ml

Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agar Muller Hinton (MH)
- Agar tripticasa sota (TSA)
- Antiseros diagnósticos O y H
- Caldo Tripticasa Soya (TSB)
- Solución de NaCl al 0.85%
- Solución fisiológica formolada al 6%

Cepas bacterianas

Cepas control positivo: *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Infantis* GTC.2MA.

Cepa control negativo: *E. coli* ATCC 25922.

PROTOCOLO

Realizarlo en un aislado bioquímicamente confirmado como *Salmonella*.

Cepa de *Salmonella*

- Sembrar las cepas de *Salmonella* spp. a analizarse en agar no selectivo (agar Muller Hinton) e incubar por 24 h a 37°C.

Preparación del reactivo

- Equilibrar todos los materiales a temperatura ambiente antes de realizar las pruebas.
- Reconstituir el producto, añadiendo 3 ml de solución de NaCl al 0,85% estéril. Los antiseros reconstituidos se consideran como diluciones 1:2.

Análisis de la cepa aislada para determinar la auto-aglutinación

1. A partir de un cultivo de prueba en medio no selectivo, transferir un asa llena de crecimiento a una gota de solución salina estéril al 0,85% en un portaobjetos limpio, y emulsionar el organismo.
2. Girar el portaobjetos durante 1 min y luego observar para determinar si se ha producido aglutinación granular.
3. Si ocurre la aglutinación con gránulos (autoaglutinación), el cultivo es rugoso y no se podrá analizar. Realizar un sub cultivo en agar no selectivo, incubar y volver a analizar el organismo tal como se describe en los pasos 1 y 2.
4. Si no ocurre ningún tipo de aglutinación, realizar el análisis del organismo.

Serotipificación somática (aglutinación en porta objetos), ver Flujograma de serotipificación

- Mezclar una gota de antisuero polivalente somático Poly A-I y VI con una suspensión bacteriana en un porta objetos.
- Agitar el porta objetos por un minuto y observar aglutinación. La presencia de gránulos indica una reacción positiva.

Agglutinación con antisuero de grupo O

El procedimiento se describe para la serotipificación de 3 importantes serotipos de *Salmonella* relacionados con la salud pública.

***Salmonella* Infantis**

- Mezclar una gota de antisuero de grupo O, antisuero Poly B (grupos somáticos presentes: C1, C2, F, G, H) con una suspensión bacteriana en un porta objetos.
- Agitar el porta objetos por un minuto y observar aglutinación. La presencia de gránulos indica una reacción positiva, posiblemente al grupo somático C1 (posible *S. Infantis*).
- Mezclar una gota de antisuero de factor O, antisuero grupo C1 (factores presentes: 6, 7, 14) con una suspensión bacteriana en un porta objetos.
- Agitar el porta objetos por un minuto y observar aglutinación. La presencia de gránulos indica una reacción positiva a los factores 6, 7, 14 (posible *S. Infantis*).

***Salmonella* Enteritidis y Typhimurium**

- Mezclar una gota de antisuero de grupo O, antisuero Poly A (grupos somáticos presentes: A, B, D, E1, E4, L) con una suspensión bacteriana en un porta objetos.
- Agitar el porta objetos por un minuto y observar aglutinación. La presencia de gránulos indica una reacción positiva, posiblemente al grupo somático D (posible *S. Enteritidis*) o al grupo somático B (posible *S. Typhimurium*).
- Mezclar una gota de antisuero de factor O, antisuero grupo D1 (factores presentes: 1, 9, 12) con una suspensión bacteriana en un porta objetos.
- Agitar el porta objetos por un minuto y observar aglutinación. La presencia de gránulos indica una reacción positiva a los factores 1, 9, 12 (posible *S. Enteritidis*).

En caso de ser negativa: mezclar una gota de antisuero de factor O, antisuero grupo B (factores presentes: 1, 4, 5, 12) con una suspensión bacteriana en un porta objetos. Agitar el porta objetos por un minuto y observar aglutinación. La presencia de gránulos indica una reacción positiva a los factores 1, 4, 5, 12 (posible *S. Typhimurium*).

Nota: Después de la aglutinación con los antisueros O, se tiene que realizar la aglutinación con antisuero H. *Salmonella* a menudo posee dos tipos de antígenos H (fase 1 y fase 2). Si una fase H es negativa para las cepas bifásicas, debe usarse un método de inversión de fase. La fase H dominante se reprime con un método de inversión de fase. Al reprimir la fase H dominante, la segunda fase H puede ser expresada e identificada (ISO, 2014).

Utilizar el método de puente de papel para la inversión de fase según Chiou y colaboradores (Chiou et al., 2006), ver **Figura 1**.

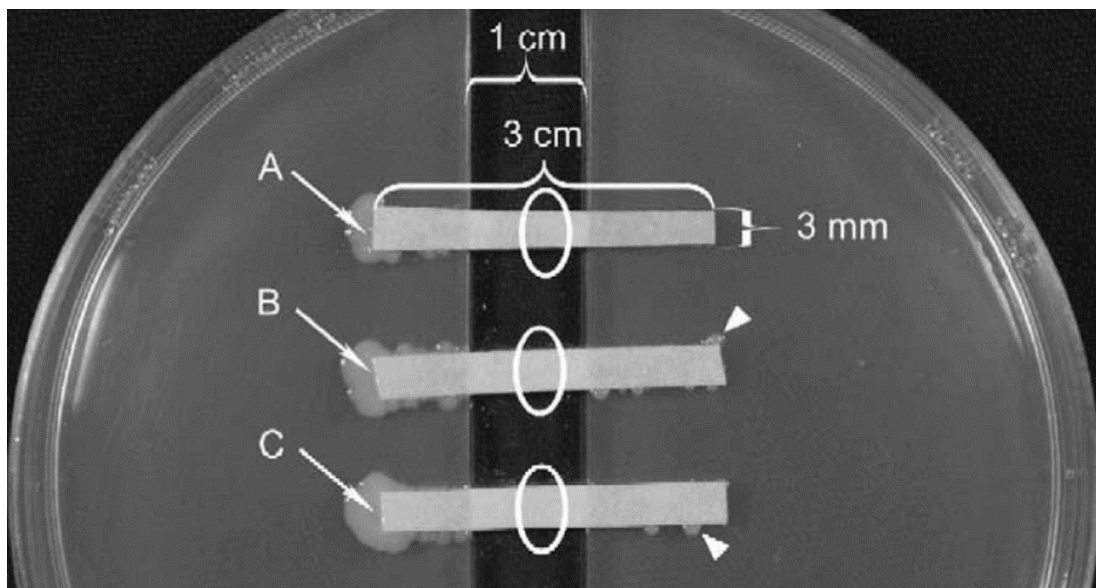


Figura D1. Gota del suero de inversión en la mitad de la tira, crecimiento bacteriano en el borde extremo derecho de la tira con una fase H dominante reprimida y colonias de *Salmonella* en el extremo izquierdo de la tira con fase H no dominante expresada.

Inversión de fase

- Preparar agar tripticasa soya (TSA).
- Retirar una tira de agar TSA (1 cm de ancho) para hacer una ranura a través del centro de la placa.
- Colocar las tiras de papel filtro (3 mm x 3 cm) a través de la ranura.
- Preparar una dilución 1:10 del antisuero de inversión de fase flagelar deseada con solución salina 0.85%.
- Depositar una gota del suero de inversión de fase en la mitad del papel filtro.
- Inocular las cepas de *Salmonella* (*S. Infantis* o *S. Typhimurium*) en el extremo izquierdo de las tiras.
- Incubar a 37°C por 16 a 24 h.

Nota: después de la incubación, las variantes de fase, que expresan un antígeno flagelar alternativo (desde el centro de la tira), migran hacia el extremo derecho de la tira.

Ejemplo: la incubación de *S. Infantis* fase 1 [r], con antisuero r permitirá el crecimiento y propagación de *S. Infantis* fase 2 [1,5].

- Observar el crecimiento bacteriano alrededor del borde del extremo derecho de la tira (indicado por los puntos triangulares), **ver Figura D1**.
- Transferir el cultivo a un tubo con caldo tripticasa soya (TSB).
- Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h.
- Preparar una *suspensión del organismo de prueba* utilizando volúmenes iguales de cultivo de TSB y solución salina formalinizada al 0,6% estéril.

Nota: La densidad final de esta suspensión de prueba debe ser equivalente al patrón de turbidez No. 3 de McFarland.

Seguir el procedimiento descrito anteriormente para las cepas control.

Continuar con el procedimiento descrito en la parte de serotipificación flagelar.

Serotipificación flagelar (aglutinación en tubo), ver Flujograma de serotipificación flagelar

- Sembrar las posibles cepas de *S. Infantis*, *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium* en 5ml de caldo tripticasa soya (TSB) e incubar a 37°C por 24 h.
- Realizar la inversión de fase para *S. Infantis* y *S. Typhimurium*, ver **Inversión de fase**.
- Para la mayoría de los antisueros H para *Salmonella* preparar una dilución de 1:125 añadiendo 0,1 ml de antisuero reconstituido (con factores H para identificar los diferentes serotipos) a 12.5 ml de solución de NaCl al 0,85%.
- Mezclar en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm cantidades iguales (0,5 ml) de antisuero diluido y la suspensión del organismo de prueba (preparada anteriormente), la dilución final es de 1:500.
- Incubar todo los tubos en baño María a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 1 hora.
- Efectuar la lectura para determinar floculación (aglutinación).

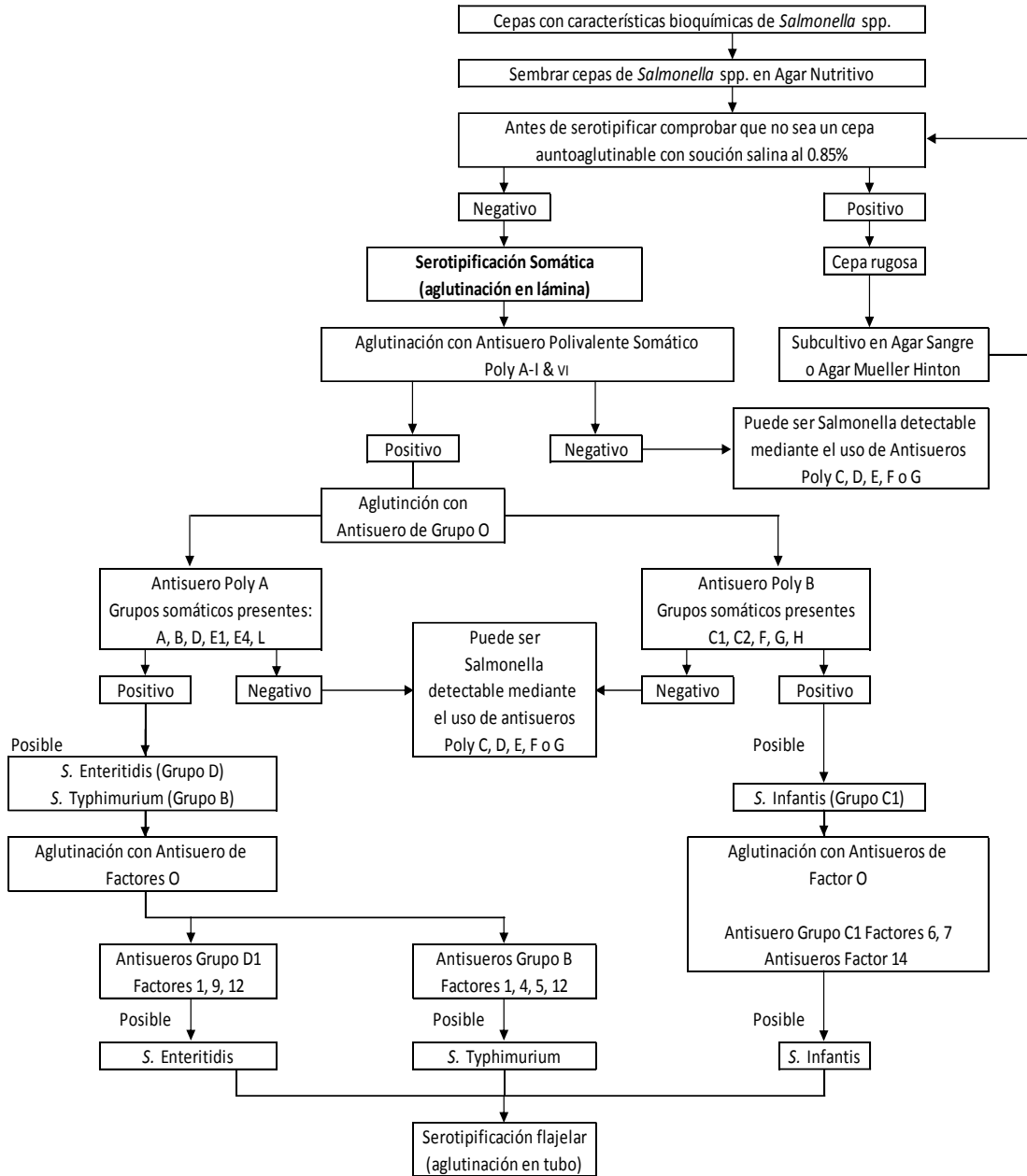
La presencia de floculación indica una reacción positiva con antisueros factor H, y para asignarle un nombre de serotipo y su fórmula correspondiente utilizar el esquema de White-Kauffmann-Le Minor, un ejemplo se puede observar en la **Tabla D1**.

Tabla D1. Fórmula genética de 3 importantes serotipos de *Salmonella* relacionados con la salud pública (Grimont y Weill, 2007)

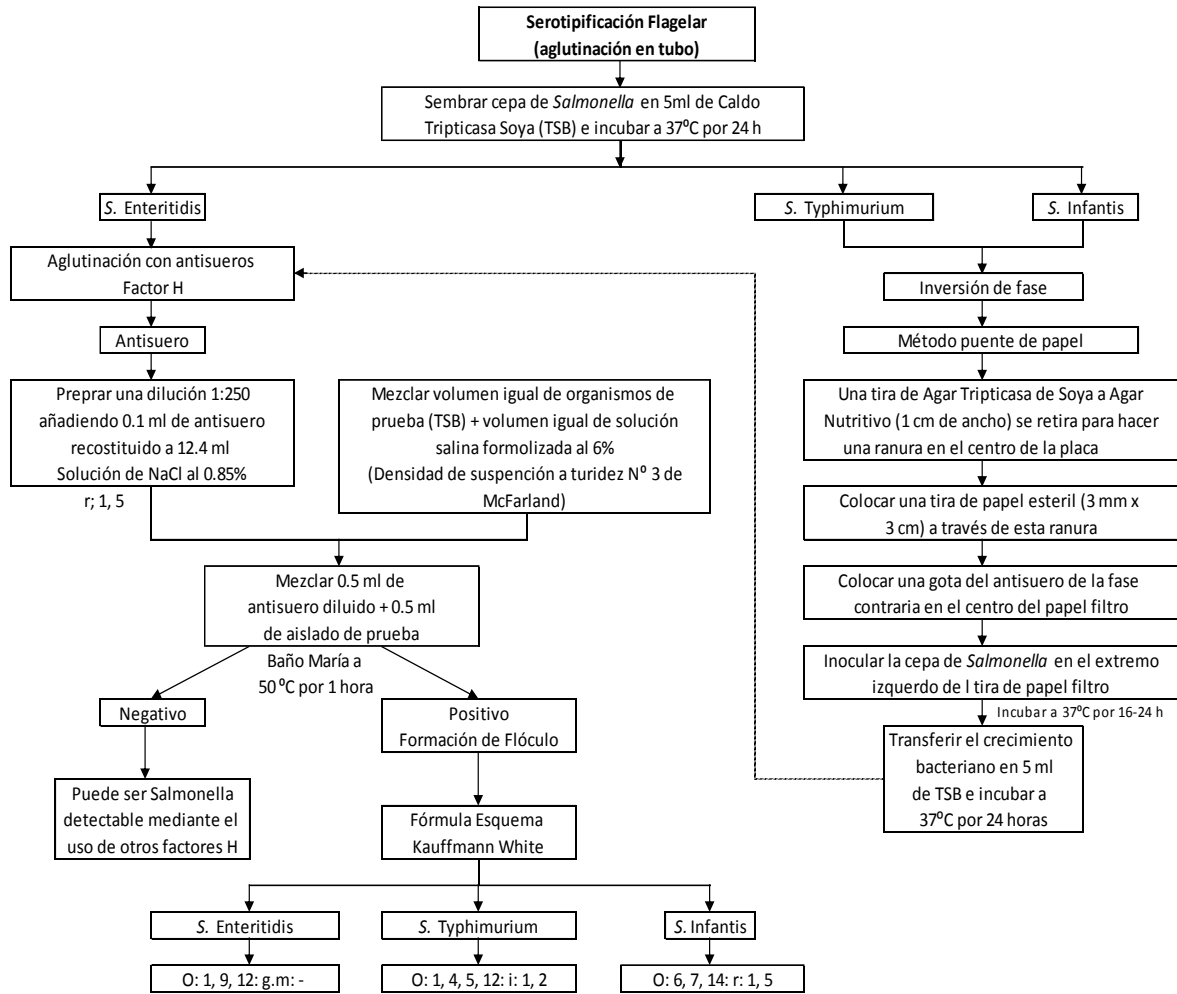
Nombre	antígenos O	antígenos H	
		fase I	fase II
<i>Salmonella</i> Infantis	6,7, <u>14</u>	r	1,5
<i>Salmonella</i> Enteritidis*	<u>1</u> ,9,12	g,m	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<u>1</u> ,4[5],12	i	1,2

Nota. Además de los factores H: g, m, algunas cepas pueden tener factor H: p o H: f o H: t. Las cepas excepcionales pueden tener antígeno H: 1,7 como segunda fase.

Flujograma de Serotipificación para *S. Enteritidis*, *Typhimurium* e *Infantis*



Flujograma de Serotipificación para *S. Enteritidis*, *Typhimurium* e *Infantis*



ANEXO E. Método de microdilución en caldo para *Salmonella* spp.

MATERIALES

Equipos y materiales

- Autoclave
- Caja Petri estéril
- Densimat
- Hisopos estériles
- Incubadora $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Micropipeta multicanal
- Matraz Erlenmeyer 500 ml

Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agar lisina desoxicolato, 10 ml por caja Petri.
- Agar nutritivo, 10 ml por caja Petri.
- Caldo Mueller-Hinton, 11 ml.
- Sensititre® placa EUVSEC (Trek Diagnostic Sistemas LTD).
- Solución salina: NaCl 0.85%, 3 ml.

Cepas utilizadas

Cepa de *Salmonella* spp. crioconservada en caldo triptosa (200 μl) más glicerol (400 μl) en una relación 1:2.

Cepa control de *E. coli* ATCC 25922.

PROTOCOLO

- Descongelar las cepa de *Salmonella* crio conservadas en TBX a -80°C .

Nota: Manejar las cepas junto a un gel refrigerante.

- Tomar una asada de la suspensión y sembrar en medio XLD por el método de estriación.
- Seleccionar una colonia y enseguida inocular (método de estriación) en un agar nutritivo para obtener colonias separadas.
- Incubar durante la noche a 37°C . Compruebe la pureza.
- Tomar 4-5 colonias separadas e idénticas con un asa descartable de 10 μl y suspender en una solución salina estéril para obtener una concentración de 0,5 McFarland (medición de la Densimat).

Nota: añadir solución salina o más microorganismos para ajustar la densidad de la suspensión del organismo a 0.5 McFarland.

- Añadir 10 μl de la suspensión del organismo a 0.5 McFarland a los 11 ml del caldo Mueller-Hinton.
- Hacer vórtex y verter en un recipiente estéril (caja de Petri).
- Llenar cada pocillo de la placa de Sensititre con 50 μl de suspensión bacteriana con la ayuda de una micropipeta multicanal.
- La distribución de los antibiótico con sus diferentes concentraciones se puede ver el en **Gráfico E1**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SMX 1024	TMP 32	CIP 8	TET 64	MERO 16	AZI 64	NAL 128	CHL 128	TGC 8	COL 16	AMP 64	GEN 32
B	SMX 512	TMP 16	CIP 4	TET 32	MERO 8	AZI 32	NAL 64	CHL 64	TGC 4	COL 8	AMP 32	GEN 16
C	SMX 256	TMP 8	CIP 2	TET 16	MERO 4	AZI 16	NAL 32	CHL 32	TGC 2	COL 4	AMP 16	GEN 8
D	SMX 128	TMP 4	CIP 1	TET 8	MERO 2	AZI 8	NAL 16	CHL 16	TGC 1	COL 2	AMP 8	GEN 4
E	SMX 64	TMP 2	CIP 0.5	TET 4	MERO 1	AZI 4	NAL 8	CHL 8	TGC 0.5	COL 1	AMP 4	GEN 2
F	SMX 32	TMP 1	CIP 0.25	TET 2	MERO 0.5	AZI 2	NAL 4	FOT 1	TGC 0.25	TAZ 2	AMP 2	GEN 1
G	SMX 16	TMP 0.5	CIP 0.12	CIP 0.03	MERO 0.25	MERO 0.06	FOT 4	FOT 0.5	TAZ 8	TAZ 1	AMP 1	GEN 0.5
H	SMX 8	TMP 0.25	CIP 0.06	CIP 0.015	MERO 0.12	MERO 0.03	FOT 2	FOT 0.25	TAZ 4	TAZ 0.5	POS CON	POS CON

Gráfico E1. Distribución y rango de concentración ($\mu\text{g/ml}$) de los diferentes antibióticos en la placa EUVSEC con 96 pocillos.

- Sellar la placa del Sensititre con el plástico adhesivo suministrado.
- Incubar a $37 \pm 5^\circ\text{C}$ por 20-24h.

Nota: Apilar en grupos de no más de 3 placas para la incubación. La lectura del MIC se realiza sin quitar el plástico de la placa EUVSEC.

- Leer primero el control positivo. Sólo cuando los resultados de MIC del control positivo tienen los rangos predefinidos, los otros resultados pueden ser analizados.

Lectura de los resultados de la prueba:

- Comprobar el crecimiento en la placa EUVSEC.
- El control positivo interno debe ser claramente visible como un depósito de células (turbidez) en la parte inferior de los pocillos sin antibiótico.
- La MIC es la concentración más baja de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible (desviación aceptable para la determinación de MIC es de \pm un paso de dilución). Así, el punto final es el primer pozo que inhibe el crecimiento visual, ver **Gráfico E2**.

Nota: Consideración especial para la sulfametoxazol y/o trimetoprima. Ignorar el crecimiento cuando el crecimiento es inferior al 20% en comparación con el control positivo interno.

- Si no hay crecimiento se debe leer como inferior o igual a la concentración mínima de un antibiótico que inhibe el crecimiento en la placa EUVSEC.
- Si en la placa hay más de un salto, no leer.
- Una sola contaminación puede ser ignorado, pero cuando más de una se sospecha contaminada la placa no se puede leer.

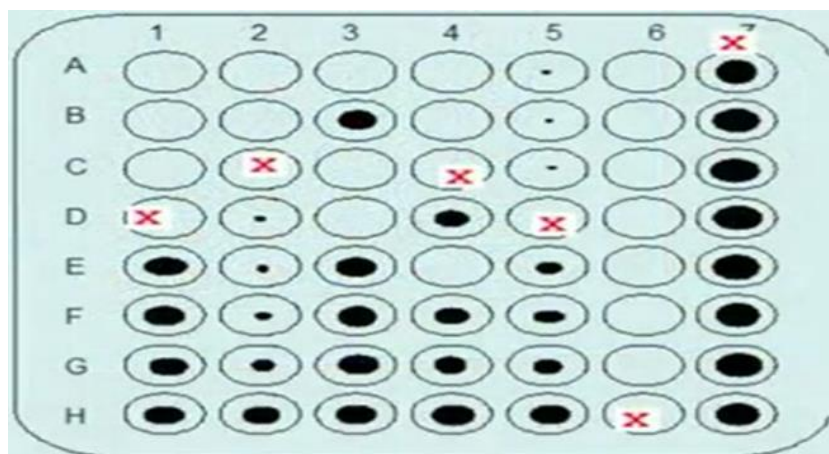


Gráfico E2. Las equis (X) representan la MIC o la concentración mínima para inhibir el crecimiento de *Salmonella*.

Nota: Utilizar los valores de corte epidemiológico (ECOFFs) del EUCAST y del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (CLSI, 2017; EUCAST, 2017) para determinar la resistencia de *Salmonella* spp., ver **Tabla E1**. Distribución de la MIC incluyen los datos recopilados a partir de múltiples fuentes, áreas geográficas y períodos de tiempo y nunca pueden utilizarse para inferir las tasas de resistencia (EUCAST, 2017).

Tabla E1. Valores de corte epidemiológico (ECOFF) del EUCAST para determinar la resistencia de *Salmonella* spp.

Antibiótico	ECOFF µg/ml (R>)	Otros cut-off
Sulfametoxazol (SMX)	256	el valor del cut-off es de ≤ 512 de acuerdo al CLSI, 2017
Gentamicina (GEN)	2	
Ciprofloxacina (CIP)	0,064	
Ampicilina (AMP)	8	
Cefotaxima (FOT)	0,5	
Ceftazidima (TAZ)	2	
Tetraciclina (TET)	8	
Trimetoprim (TMP)	2	
Cloranfenicol (CHL)	16	
Colistina (COL)	2	el valor del cut-off es de 2 de acuerdo al EUCAST, 2015
Ácido nalidíxico (NAL)	16	
Azitromicina (AZI)	16	el valor de cut-off es de ≤ 32 de acuerdo al CLSI, 2017
Tigeciclina (TGC)	8	
Meropenem (MERO)	0,125	

Nota. R> = existe resistencia cuando la MIC es mayor a los valores de corte epidemiológicos

ANEXO F. Método de PCR simple para detectar genes β -lactamasa

MATERIALES

Equipos y materiales

Tubos de 1,5 ml y 0,2 ml	Centrífuga a 13300 rpm
Termo bloque	Flexicast horizontal con fuente de poder
Micro pipetas para varios volúmenes	Microondas
Puntas para varios volúmenes	Termociclador
Bloque térmico a 90°C con agitación	Trans-iluminador
Cámara de seguridad biológica	Cámara de fotos

Reactivos

Medio Agarosa ultra pura	Primer CMY-2
Agua ultra pura libre de ADNasa	Primer CTX-MU
Cloruro de Magnesio, 25 mM	Primer CTX-M-(1, 2, 8 y 9)
DNTPs mix, 10 mM	Primer KPC
EDTA, 0.5 M	Primer MCR-1 y MCR-2
Taq AND polimerasa, 5U/ μ l	Primer SHV
Buffer de carga	Proteinasa K, 20mg/ml
Marcador molecular, 1000pb	SYBER® SAFE
Primer TEM-1	Buffer TBE, 10X

PROCESO

- Obtener colonias a partir del medio TSI

Extracción o lisado de colonias de *Salmonella*

- Suspender una asada de colonias del medio TSI o LIA en 400 μ l de solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%.
- Colocar los tubos Eppendorf en el termo bloque a 90°C por 20 min.
- Centrifugar la suspensión a 13 300 rpm por 5 min.
- Retirar el sobrenadante

Nota: conservar los lisados de ADN a -20°C.

Cuantificación del ADN

- Colocar 2 μ l de H₂O estéril, sobre el pedestal del Nano Drop 2000 y blanquear el equipo, mediante la utilización del programa Nucleic Acid®
- Colocar 2 μ l de cada muestra procedente de la extracción de ADN, cuantificar con el programa Nucleic Acid®
- Exportar los datos obtenidos del programa de cuantificación, que registra las longitudes de onda de 260/230 y 260/280 nm y analizar dichos datos.

Nota: El pedestal del Nano-Drop 2000, debe ser limpiado tras cada nueva muestra con papel absorbente. Las muestras con exceso de ADN proceder a diluir.

PROTOCOLO

Utilizar los primers o cebadores y cepas controles descritos en la **Tabla F1**.

Tabla F1. Secuencia de primers específicos para la detección de genes resistentes a los diferentes antimicrobianos

Genes objetivo	Nombre del primer	Secuencia 5' a 3'	Tamaño de amplicón (pb)	C. Positivos
<i>bla</i> TEM-1	TEM front			
	P1	GCGGAACCCCTATTTG	964	4CT20A
<i>bla</i> SHV	TEM C-R-ny	ACCAATGCTTAATCAGTGAG		
	SHV OS5	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	854	TIAC-361A
<i>bla</i> CTX-M-UI	SHV OS6	GATTTGCTGATTTGCTCGG		
	CTX-M-UI1	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	593	
<i>bla</i> CTX-M-1	CTX-M-UI2	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYSAGCGG		
	CTX1-SEQ-F	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	1100	CTX-M-1A
<i>bla</i> CTX-M-2	CTX1-SEQ-R	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG		
	CTX-M-2F	ATGATGACTCAGAGCATTTCG	900	CTX-M-2-A
<i>bla</i> CTX-M-8	CTX-M-2R	TGGGTTACGATTTTCGCCGC		
	CTX-Mgp8-F	TGATGAGACATCGCGTTAAG	800	CTX-M-8-A
<i>bla</i> CTX-M-9	CTX-Mgp8-R	TAACCGTCGGTGACGATTTT		
	CTX G-9 F	AAAAGGATCCTTGATGGTTGCTCTGTGG	1100	CTX-M-9-A
<i>bla</i> CMY-2	CTX-G-9R	AAAAGGATCCCATTATTCAACAAAACC AG		
	Qeprev cmy-2 startF	ATGATGAAAAAATCGTTATGCTGC	1138	TIAC811
<i>bla</i> KPC	cmy-group2-R	GCTTTTCAAGAATGCGCCAGG		
	KPCF	TGTCACTGTATCGCCGTC	879	KPC-A
	KPCR	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		

Nota. F = forward primer; R = reverse primer; bp = pares de bases; C. positivo = Cepas control positivo a genes de resistencia; A = adenina; G = guanina; C = citocina; T = timina; genes del grupo *bla*TEM-1, *bla*SHV, *bla*CTX-M y CMY-2 = genes con capacidad de codificar ESBL y; *bla*KPC = gen que codifican *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas.

Amplificación por PCR de los diferentes genes de resistencia antimicrobiana

Número de reacciones: el volumen del master mix será calculada para 12 reacciones, en todas las amplificaciones de los diferentes genes.

Primer TEM (gen *bla*TEM-1)

Fragmento a amplificar: 964 pares de bases (bp).

- Preparar el master mix en un tubo de 1.5 ml, colocado a 0° C, previamente realizar los cálculos para un volumen de reacción final de 25 µl, y añadir los reactivos en el orden que se muestra en la **Tabla F2**.

Tabla F2. Volúmenes de los reactivos y primer para realizar el mastermix

Reactivo	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción (µl)	VF mastermix (µl)
	cantidad	unidad	cantidad	unidad		
Agua	-		-		14,875	178,5
Template	?		?		2	<u>12</u>
Buffer	5	x	1	x	5	60
MgCl ₂	25	mM	2	mM	2	24
dNTP Mix	10	mM	0,2	mM	0,5	6
TEM1	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,25	3
TEM2	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,25	3
Taq	5	U/µl	0,025	U/µl	0,125	1,5
Total					25	300

Nota. VF = volumen final; C. inicial = concentración inicial de los reactivo; C. final = concentración a la que se desea llegar dentro del mix

- Dispensar 23 µl del mix en tubos de 200 µl, colocados con anticipación a 0° C.
- Una vez en el termociclador (Termociclador, SimpliAmp™, REF A 42812, 228002955), a cada tubo de 200 µl agregar 2 µl de muestra proveniente de la extracción; para el control positivo colocar 1 µl.
- Amplificar las muestras en el termociclador según los parámetros de la **Tabla F3**.

Tabla F3. Parámetros ingresados en el termociclador para el primer TEM, en la identificación del gen *bla*TEM-1

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94.0	4'
Desnaturalización*	94.0	1'
Hibridación*	56.0	1'
Elongación*	72.0	1'
Extensión final	72.0	8'

Nota. Parámetros que se realizaron en cada ciclo; 'minutos, ''segundos

- Preparar gel de agarosa al 1% (100 ml de TBE 0.5X más 1 g agarosa) y por cada 10 ml de buffer TBE 0.5X colocar 1 μ l SYBR® SAFE
- Colocar el gel en el Flexicast horizontal
- Colocar 3.5 μ l de la muestras en los pocillos con 1 μ l de loader buffer 10X.
- Colocar 2 a 2.5 μ l del marcador.
- Colocar 2 μ l del control positivo (4CT20A).
- Electroforesis por 30 min.
- Visualizar con el trans-iluminador UV, en el gel, las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular.
- Tomar una foto del gel y determinar si existe alguna banda con peso molecular igual a control positivo.

Las condiciones de amplificación para cada PCR son de acuerdo a las siguientes tablas.

Primer SHV (gen *blaSHV*)

Fragmento a amplificar: 854 pares de bases (bp).

Tabla F4. Volúmenes de los reactivos y primer para realizar el mastermix

Reactivo	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción (μ l)	VF mastermix (μ l)
	cantidad	unidad	cantidad	unidad		
Agua	-		-		15,875	190,5
Template	?		?		1	<u>12</u>
Buffer	5	x	1	x	5	60
MgCl ₂	25	mM	2	mM	2	24
dNTP Mix	10	mM	0,2	mM	0,5	6
SHV1	100	pmol/ μ l	1	pmol/ μ l	0,25	3
SHV2	100	pmol/ μ l	1	pmol/ μ l	0,25	3
Taq	5	U/ μ l	0,025	U/ μ l	0,125	1,5
Total					25	300

Nota. VF = volumen final; C. inicial = concentración inicial de los reactivo; C. final = concentración a la que se desea llegar dentro del mix

Tabla F5. Parámetros ingresados en el termociclador para el primer SHV, en la identificación del gen *blaSHV*

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94.0	5'
Desnaturalización*	94.0	1' } 35 ciclos
Hibridación*	62.0	1' }
Elongación*	72.0	1' }
Extensión final	72.0	7'

Nota. Parámetros que se realizaron en cada ciclo; 'minutos, ''segundos

- Colocar 2 μ l del control positivo (TIAC-361A).

Primer CTX-M-UI (gen *bla*CTX-M)

Fragmento a amplificar: 593 pares de bases (bp).

Tabla F6. Volúmenes de los reactivos y primer para realizar el mastermix

Reactivo	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción (µl)	VF mastermix (µl)
	cantidad	unidad	cantidad	unidad		
Agua	-		-		15,875	190,5
Template	?		?		1	<u>12</u>
Buffer	5	x	1	x	5	60
dNTP Mix	10	mM	0,2	mM	0,5	6
MgCl ₂	25	mM	2	mM	2	24
CTX-MU1F	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,25	3
CTX-MU2R	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,25	3
Taq	5	U/µl	0,025	U/µl	0,125	1,5
Total					25	300

Nota. VF = volumen final; C. inicial = concentración inicial de los reactivos; C. final = concentración a la que se desea llegar dentro del mix

Tabla F7. Parámetros ingresados en el termociclador para el primer CTX-M-UI, en la identificación del gen *bla*CTX-M-UI

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94.0	5'
Desnaturalización*	94.0	30''
Hibridación*	60.0	30''
Elongación*	72.0	1'
Extensión final	72.0	7'

Nota. Parámetros que se realizaron en cada ciclo; 'minutos, ''segundos

- Colocar 1 µl del control positivo (CTX-M-UI).

Primer CTX-M-2 (gen *bla*CTX-M-2)

Fragmento a amplificar: 900 pares de bases (bp).

Tabla F8. Volúmenes de los reactivos y primer para realizar el mastermix

Reactivo	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción (µl)	VF mastermix (µl)
	cantidad	unidad	cantidad	unidad		
Agua	-		-		13,875	166,5
Template	?		?		3	<u>12</u>
Buffer	5	x	1	x	5	60
dNTP Mix	10	mM	0,2	mM	0,5	6
MgCl ₂	25	mM	2	mM	2	24
CTXM-2f	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,25	3
CTXM-2r	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,25	3
Taq	5	U/µl	0,025	U/µl	0,125	1,5
Total					25	300

Nota. VF = volumen final; C. inicial = concentración inicial de los reactivos; C. final = concentración a la que se desea llegar dentro del mix

Tabla F9. Parámetros ingresados en el termociclador para el primer CTX-M-2, en la identificación del gen *bla*CTX-M-2

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94.0	5'
Desnaturalización*	94.0	1'
Hibridación*	55.0	30''
Elongación*	72.0	1'
Extensión final	72.0	7'

Nota. Parámetros que se realizaron en cada ciclo; 'minutos, ''segundos

- Colocar 3 µl del control positivo (CTX-M-2-A).

Primer *bla*CTX-M-8 (gen *bla*CTX-M-8)

Fragmento a amplificar: 800 pares de bases (bp).

Tabla F10. Volúmenes de los reactivos y primer para realizar el mastermix

Reactivo	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción (µl)	VF mastermix (µl)
	cantidad	unidad	cantidad	unidad		
Agua	-		-		11,375	136,5
Template	?		?		1,5	<u>12</u>
Buffer	5	x	1	x	5	60
dNTP Mix	10	mM	0,2	mM	0,5	6
MgCl ₂	25	mM	5,5	mM	5,5	66
CTX-M-8F	100	pmol/µl	2	pmol/µl	0,5	6
CTX-M-8R	100	pmol/µl	2	pmol/µl	0,5	6
Taq	5	U/µl	0,025	U/µl	0,125	1,5
Total					25	300

Nota. VF = volumen final; C. inicial = concentración inicial de los reactivos; C. final = concentración a la que se desea llegar dentro del mix

Tabla F11. Parámetros ingresados en el termociclador para el primer CTX-M-8, en la identificación del gen *bla*CTX-M-8

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95.0	5'
Desnaturalización*	95.0	30''
Hibridación*	61.0	30''
Elongación*	72.0	30''
Extensión final	72.0	5'

Nota. Parámetros que se realizaron en cada ciclo; 'minutos, ''segundos

- Colocar 1,5 µl del control positivo (CTX-M-8-A).

Primer CTX-M-9 (gen *bla*CTX-M-9)

Fragmento a amplificar: 1100 pares de bases (bp).

Tabla F12. Volúmenes de los reactivos y primer para realizar el mastermix

Reactivo	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción (µl)	VF mastermix (µl)
	cantidad	unidad	cantidad	unidad		
Agua	-		-		11,335	136,02
Template	?		?		3	<u>12</u>
Buffer	5	x	1	x	5	60
dNTP Mix	10	mM	0,2	mM	0,5	6
MgCl ₂	25	mM	4	mM	4	48
CTX-M-9F	10	pmol/µl	0,2	pmol/µl	0,5	6
CTX-M-9R	10	pmol/µl	0,2	pmol/µl	0,5	6
Taq	5	U/µl	0,033	U/µl	0,165	1,98
Total					25	300

Nota. VF = volumen final; C. inicial = concentración inicial de los reactivos; C. final = concentración a la que se desea llegar dentro del mix

Tabla F13. Parámetros ingresados en el termociclador para el primer CTX-M-9, en la identificación del gen *bla*CTX-M-9

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95.0	10'
Desnaturalización*	95.0	1'
Hibridación*	55.0	1'
Elongación*	72.0	1'
Extensión final	72.0	10'

Nota. Parámetros que se realizaron en cada ciclo; 'minutos, ''segundos

- Colocar 3 µl del control positivo (CTX-M-9-A).

Primer KPC (gen *blaKPC*)

Fragmento a amplificar: 916 pares de bases (bp).

Tabla F14. Volúmenes de los reactivos y primer para realizar el mastermix

Reactivo	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción (µl)	VF mastermix (µl)
	cantidad	unidad	cantidad	unidad		
Agua	-		-		7,51	90,12
Template	?		?		2	<u>12</u>
Buffer	5	x	1	x	3	36
dNTP Mix	10	mM	0,2	mM	0,3	3,6
MgCl ₂	25	mM	3	mM	1,8	21,6
KPC-1	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,15	1,8
KPC-2	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,15	1,8
Taq	5	U/µl	0,03	U/µl	0,09	1,08
Total					15	180

Nota. VF = volumen final; C. inicial = concentración inicial de los reactivos; C. final = concentración a la que se desea llegar dentro del mix

Tabla F15. Parámetros ingresados en el termociclador para el primer KPC, en la identificación del gen *blaKPC*

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95.0	5'
Desnaturalización*	95.0	30''
Hibridación*	55.0	30''
Elongación*	72.0	30''
Extensión final	72.0	5'

Nota. *Parámetros que se realizaron en cada ciclo; 'minutos, ''segundos

- Colocar 2 µl del control positivo (KPC-A).

Primer CMY (gen *bla*CMY-2)

Fragmento a amplificar: 1138 pares de bases (bp).

Número de muestras 11(más uno)

Tabla F16. Volúmenes de los reactivos y primer para realizar el mastermix

Reactivo	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción (μl)	VF mastermix (μl)
	cantidad	unidad	cantidad	unidad		
Agua	-		-		15,875	190,5
Template	?		?		1	<u>12</u>
Buffer	5	x	1	x	5	60
dNTP Mix	25	mM	2	mM	2	24
MgCl ₂	10	mM	0,2	mM	0,5	6
CMY-1	100	pmol/μl	1	pmol/μl	0,25	3
CMY-2	100	pmol/μl	1	pmol/μl	0,25	3
Taq	5	U/μl	0,025	U/μl	0,125	1,5
Total					25	300

Nota. VF = volumen final; C. inicial = concentración inicial de los reactivos; C. final = concentración a la que se desea llegar dentro del mix

Tabla F17. Parámetros ingresados en el termociclador para el primer CMY, en la identificación del gen *bla*CMY-2

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94.0	5'
Desnaturalización*	94.0	1' } 35 ciclos
Hibridación*	63.0	1' }
Elongación*	72.0	1' }
Extensión final	72.0	10'

Nota. Parámetros que se realizaron en cada ciclo; 'minutos, ''segundos

- Colocar 1 μl del control positivo (TIAC811).

ANEXO G. Tabla para registro de aislamiento y pruebas bioquímicas para identificación de *Salmonella* spp.

Tabla G1. Registro de aislamiento y pruebas bioquímicas para identificación de *Salmonella* spp.

Código	MSRV	XLD	TSI	LIA	SIM	UREA	<i>Salmonella</i> pp.
G1A	0	-	-	-	-	-	0
G2A	0	-	-	-	-	-	0
G3A	halo	colonia	A/A+G+H2S+	K/K+H2S+	M+H2S+Ind-	ureasa-	<i>Salmonella</i> sp.
G4A	0	-	-	-	-	-	0
G5A	0	-	-	-	-	-	0
G6A	0	-	-	-	-	-	0
G7A	0	-	-	-	-	-	0
G8A	0	-	-	-	-	-	0
G9A	0	-	-	-	-	-	0
G10A	halo	colonia	A/A+G+H2S+	K/K+H2S+	M+H2S+Ind-	ureasa-	<i>Salmonella</i> sp.
G11A	halo	colonia	A/A+G+H2S+	K/K+H2S+	M+H2S+Ind-	ureasa-	<i>Salmonella</i> sp.
G12A	halo	colonia	A/A+G+H2S+	K/K+H2S+	M+H2S+Ind-	ureasa-	<i>Salmonella</i> sp.
G13A	halo	colonia	A/A+G+H2S+	K/K+H2S+	M+H2S+Ind-	ureasa-	<i>Salmonella</i> sp.
G14A	0	-	-	-	-	-	0
G15A	halo	colonia	A/A+G+H2S+	K/K+H2S+	M+H2S+Ind-	ureasa-	<i>Salmonella</i> sp.
G16A	0	-	-	-	-	-	0
G17A	halo	colonia	A/A+G+H2S+	K/K+H2S+	M+H2S+Ind-	ureasa-	<i>Salmonella</i> sp.
G18A	0	-	-	-	-	-	0
G19A	0	-	-	-	-	-	0
G20A	0	-	-	-	-	-	0
G21A	0	-	-	-	-	-	0
G22A	0	-	-	-	-	-	0

Nota. Código = código de UNIETAR; MSRV = medio modificado semi-sólido Rappaport-Vassiliadis, Halo = zona turbia blanca grisácea por migración de *Salmonella*; XLD = agar xilosa lisina desoxicolato, colonia = colonia con centro negro y bore color rojizo ligeramente transparente; TSI = agar triple azúcar hierro, A/A+G+H2S+ = pico amarillo, producción de ácido a partir de la fermentación de lactosa y/o sacarosa / fondo amarillo, producción de ácido a partir de la fermentación de glucosa + gas + sulfuro de hidrógeno; LIA = agar hierro lisina, K/K+H2S+ = pico y fondo purpura, reacción alcalina a través del medio por decarboxilación de la lisina + sulfuro de hidrógeno; SIM = agar azufre indol motilidad, M+H2S+ind- = movilidad (medio turbio) + sulfuro de hidrógeno + anillo amarillo, sin producción de indol; ureasa- = no se encuentra la enzima ureasa para catalizar la urea; *Salmonella* spp. = salmonelas no identificadas su serotipo; *Salmonella* sp. = salmonela no identificada su serotipo.

ANEXO H. Tablas de registro de serotipificación somática y flagelar de aislados de *Salmonella* spp.

Tabla H1. Registro de serotipificación somática de aislados de *Salmonella* spp.

Código	L/R	Poly A	Poly B	Poly A grupo (A,B,D,E1,E4,L)	C1 (6-7)	C1 (14)	Factor (1,9,12)	Factor (1,4,5,12)
G3A	L	1	1	-	1	0	-	-
G10A	L	1	0	1	-	-	-	1
G11A	L	1	1	-	1	1	-	-
G12A	L	1	1	-	1	0	-	-
G13A	L	1	1	-	1	0	-	-
G15A	L	1	1	-	1	0	-	-
G17A	L	1	1	-	1	0	-	-

Nota. L/R = cepa de *Salmonella* lisa o rugosa; 1 = positivo; 0 = negativo; - = no realizado

Tabla H2. Registro de serotipificación flagelar de aislados de *Salmonella* spp.

Código	Flagelar						Serotipo (UNIETAR)	Serotipo (Bélgica)
	Infantis			Tiphymurium				
	Factor 1	Factor 5	r	Factor 1	Factor 2	i		
G3A	1	1	1	-	-	-	S. Infantis	-
G10A	-	-	-	0	0	0	S. sp.	S. Schwarzengrund
G11A	0	0	0	-	-	-	S. sp.	S. Mbandaka
G12A	1	1	1	-	-	-	S. Infantis	-
G13A	1	1	1	-	-	-	S. Infantis	-
G15A	1	1	1	-	-	-	S. Infantis	-
G17A	1	1	1	-	-	-	S. Infantis	-

Nota. 1 = positivo; 0 = negativo; - = no realizado; S. sp. = *Salmonella* no identificada

ANEXO J. Tablas de registro de la concentración mínima inhibitoria de serotipos de *Salmonella* para determinar resistencia

Tabla J1. Registro de los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de serotipos de *Salmonella*

Código	Serotipo	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)				
		Ampicilina	Cefotaxima	Ceftazidima	Meropenem	Colistina
3A	S. Infantis	1	0.25	0.5	0.03	1
10A	S. Schwarzengrund	1	0.25	0.5	0.03	1
11A	S. Mbandaka	1	0.25	0.5	0.03	1
12A	S. Infantis	64	4	4	0.03	1
13A	S. Infantis	64	4	4	0.03	1
15A	S. Infantis	64	4	4	0.03	1
17A	S. Infantis	64	4	8	0.03	1

Nota. MIC = concentración mínima de un agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento del patógeno.

Tabla J2. Registro del número de serotipos de *Salmonella* resistentes a los antibióticos probados

Antibiótico	No.	%R	Número de aislados de <i>Salmonella</i> con concentraciones mínimas inhibitorias (µg / ml)															
			0.02	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128		
Ampicilina	4	(57)									3						4	4
Cefotaxima	4	(57)						3					4	4				
Ceftazidima	4	(57)							3				3	1	4			
Meropenem	0	(0)	7														0	
Colistina	0	(0)									7						0	

Nota. Los campos sombreados indican el rango probado para cada agente antimicrobiano; las líneas verticales indican puntos de quiebre epidemiológico para la resistencia descritos por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, 2017); valores de corte epidemiológicos para colistina fue tal como se establece en la Decisión 2013/652 / UE (EUCAST, 2017) y %R = porcentaje de serotipos de S. Infantis resistentes a cada antibiótico.

ANEXO K. Tablas de registro de cuantificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y genes de resistencia en serotipos de *Salmonella*

Tabla K1. Registro de cuantificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cepas de *Salmonella*

Código	Serotipo	Concentración ácidos nucleicos (ng/μl)	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
G3A	S. Infantis	15,4	1,52	1
G10A	S. Schwarzengrun	31,4	1,95	1,39
G11A	S. Mbandaka	115,1	1,95	1,44
G12A	S. Infantis	92,7	1,73	1,28
G13A	S. Infantis	174,8	1,68	1,14
G15A	S. Infantis	174,5	1,73	1,29
G17A	S. Infantis	118,7	1,77	1,21

Nota. Código = código de la cepa de *Salmonella* en UNIETAR; 260/280 = es la relación de absorbancia a 260 y 280 nm utilizada para evaluar pureza de ADN y ARN. Una proporción de ~ 1,8 es aceptada generalmente como "pura" para ADN, si es apreciablemente baja indica presencia de proteína, fenol u otros contaminantes que absorben a 280, además las soluciones ácidas sub-representarán la proporción 260/280 en 0,2-0,3, mientras que una solución básica sobre-representará la proporción en 0,2-0,3.; 260/230 = es una relación de absorbancia a 260 y 230 nm. Una proporción esperada está en el intervalo de 2,0-2,2 para un ácido nucleico "puro", una relación sensiblemente inferior indica presencia de contaminantes que absorben a 230 nm.

Tabla K2. Registro de genes de resistencia en serotipos de *Salmonella* *

Código	Serotipo	TEM	SHV	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	KPC	CMY-2
3A	Infantis	-	-	-	-	-	-	-	-
10A	Schwarzengrund	-	-	-	-	-	-	-	-
11A	Mbandaka	-	-	-	-	-	-	-	-
12A	Infantis	TEM	0	0	0	0	CTX-M-9	0	0
13A	Infantis	TEM	0	0	0	0	CTX-M-9	0	0
15A	Infantis	TEM	0	0	0	0	CTX-M-9	0	0
17A	Infantis	0	0	0	0	0	CTX-M-9	0	0

Nota. Código de UNIETAR; TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, KPC y CMY-2 = genes que codifican enzimas β-lactamasas para hidrolizar antibióticos β-lactámicos; - = no aplica y 0 = negativo.

ANEXO L. Dendograma de patrones de PFGE de serotipos de *Salmonella*

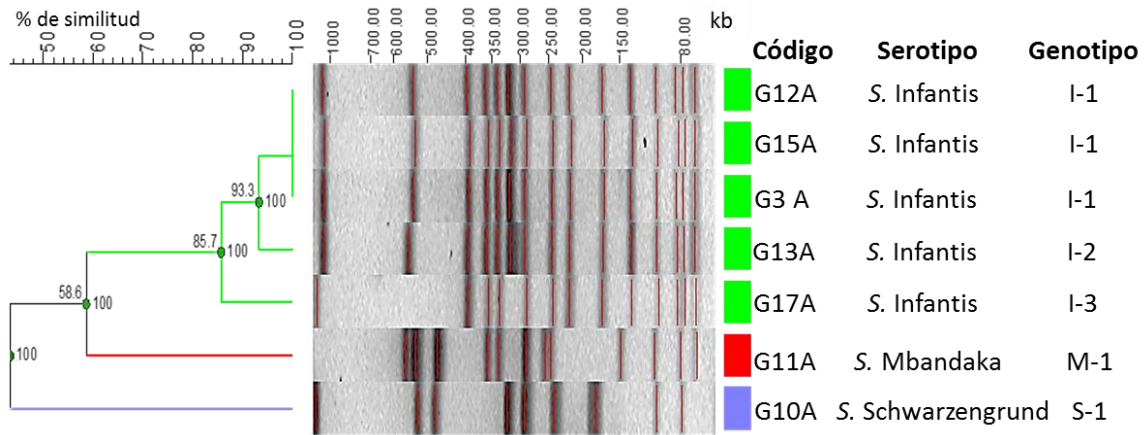


Figura L1. Dendograma de los patrones de PFGE de serotipos de *Salmonella* recuperados de contenido cecal de granjas de pollos de engorde. Los genotipos fueron identificados por una letra capital que indica el serotipo seguido por un sufijo numérico. Se destacó un grupo principal de *S. Infantis* con 3 genotipos diferentes provenientes de diferentes granjas. Además se detectó un genotipo para *S. Mbandaka* y un genotipo para *S. Schwarzengrund*. Para el análisis de similitud genética relativa se utilizó el coeficiente de Dice con una tolerancia de posición de banda de 1% y 0% de nivel de optimización. El método de los pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA) se aplicó para producir el dendograma. Cualquier diferencia en el patrón de bandas de ADN de los aislados se interpretó como un genotipo.

ANEXO M. Resultados de identificación y resistencia a los antibióticos en *Salmonella*

Tabla M1. Resultados de identificación y resistencia a antibióticos en *Salmonella* aislados en granjas de pollos de engorde en la Isla Santa Cruz, Galápagos

Código	S. spp.	Serotipo	Genotipo	Patrón de resistencia	Genes de resistencia		Variantes de genes <i>bla</i>
					<i>bla</i> TEM-1	<i>bla</i> CTX-M-9	
G1A	0	-	-	-	-	-	-
G2A	0	-	-	-	-	-	-
G3A	S. sp.	S. Infantis	I-1	0	-	-	-
G4A	0	-	-	-	-	-	-
G5A	0	-	-	-	-	-	-
G6A	0	-	-	-	-	-	-
G7A	0	-	-	-	-	-	-
G8A	0	-	-	-	-	-	-
G9A	0	-	-	-	-	-	-
		S.					
G10A	S. sp.	Schwarzengrund	S-1	0	-	-	-
G11A	S. sp.	S. Mbandaka	M-1	0	-	-	-
G12A	S. sp.	S. Infantis	I-1	AFT	<i>bla</i> TEM-1	<i>bla</i> CTX-M-9	<i>bla</i> CTX-M-65 <i>bla</i> TEM-1A
G13A	S. sp.	S. Infantis	I-2	AFT	<i>bla</i> TEM-1	<i>bla</i> CTX-M-9	<i>bla</i> CTX-M-65 <i>bla</i> TEM-1A
G14A	0	-	-	-	-	-	-
G15A	S. sp.	S. Infantis	I-1	AFT	<i>bla</i> TEM-1	<i>bla</i> CTX-M-9	<i>bla</i> CTX-M-65 <i>bla</i> TEM-136
G16A	0	-	-	-	-	-	-
G17A	S. sp.	S. Infantis	I-3	AFT	0	<i>bla</i> CTX-M-9	<i>bla</i> CTX-M-65
G18A	0	-	-	-	-	-	-
G19A	0	-	-	-	-	-	-
G20A	0	-	-	-	-	-	-
G21A	0	-	-	-	-	-	-
G22A	0	-	-	-	-	-	-

Nota. Código = código de UNIETAR; S. spp. = *Salmonellas* no identificadas; S. sp. = *Salmonella* no identificada; 0 = negativo; - = no aplica; AFT = ampicilina, cefotaxima, ceftazidima; variantes = variantes de genes del grupo *bla*TEM y *bla*CTX-M-9.

ANEXO N. Lista de abreviaciones

AGPs: antimicrobial growth promoters

AmpC: class C cephalosporinases o cephamycinases

AMR: antimicrobial resistance

AST: antimicrobial susceptibility testing

BMD: broth microdilution

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMY: cephamycinase

CTX-M: cefotaximase-Munich

CVA: clavulanic acid

DNA: deoxyribonucleic acid

DT104: *Salmonella* enterica serotype Typhimurium definitive type 104

EC: European Commission

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

ECOFF: epidemiological cut-off

ESBL: extended-spectrum β -lactamase

ESCs: extended-spectrum cephalosporins

ETAs: enfermedades transmitidas por alimentos

EU: European Union

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA: United States Food and Drug Administration

ISO: Organización Internacional de Normalización

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LIA: lisina iron agar

LPS: lipopolysaccharide

MBLs: metallo- β -lactamase

MCR: phosphoethanolamine transferase

MDR: multidrug-resistant

MIC: minimum inhibitory concentration

MSRV: modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis

NTS: Non-typhoidal *Salmonella* enterica

OIE: World Organisation for Animal Health

OXA: Oxacillin carbapenemases

PCR: polymerase chain reaction

PFGE: pulsed-field gel electrophoresis

SHV: sulfhydryl-variable beta-lactamase

SIM: sulphide indol motility

TEM: Temoneira β -lactamase

TSI: triple sugar iron

VIM: verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

WGS: whole genome sequencing

WHO: World Health Organization

XbaI: endonuclease from *Xanthomonas badrii*

ANEXO P. Traducción del resumen

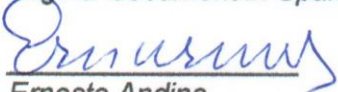
Analysis of genetic similitude and resistance to β -lactamic antibiotic and colistin in serotypes of *Salmonella* gender, derived from broiler farms in Galápagos, Ecuador.

ABSTRACT

Dissemination of antibiotic-resistant *Salmonella* serotypes in an emergent trouble worldwide. The main purpose of the current study was analyzing resistance to β -lactamic antibiotic and colistin in *Salmonella* serotypes isolated from the cecal content of fattening chicken from broiler farms located in Santa Cruz Island, Galápagos. Twenty two samples were taken for serotyping of *Salmonella* pursuant to ISO 6579 standard. The most prevailing serotype was *S. Infantis* with 71.4% (5/7) followed by *S. Schwarzengrund* and *S. Mbandaka* with 14.3% (1/7), respectively. By using EUVSEC plates, 80% (4/5) of *S. Infantis* showed a phenotype resistant to ampicillin, cefotaxime and ceftazidime (AFT). With a final point polymerase chain reaction (PCR) test, gens of the *bla*CTX-M-9 and *bla*TEM group were found, with 80% (4/5) and 60% (3/5) respectively. Sequencing of PCR amplicons confirmed the existence of *bla*CTX-M-65 (n = 4), *bla*TEM-1A (n = 2) and *bla*TEM-136 (n = 1) gens. Results of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) revealed 5 genotypes in 3 *Salmonella* serotypes 3 genotypes of *S. Infantis* showed a similitude of 85.7%. The current study showed the existence of 3 *Salmonella* serotypes, with a clonal dissemination of *S. Infantis*, capable to encode enzymes extended spectrum β -lactamase (ESBL), in broiler farm located in Santa Cruz Island. Such serotype could compromise the clinical use of extended spectrum β -lactamic antibiotic in serious infections.

KEYWORDS: RESISTANCE / β -LACTAMIC ANTIBIOTIC / COLISTIN / BROILER FARM / GALÁPAGOS / ESBL

I CERTIFY that the above and foregoing is a true and correct translation of the original document in Spanish.



Ernesto Andino
Certified Translator
IC: 1703852317

Ernesto Andino
SWORN TRANSLATOR
English - Spanish - English
ID: 1703852317001