

Resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella enterica* de origen animal



Gonzalo Palomo Guijarro

Cáceres, 2011

Segundo Píriz Durán, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura,

Anselmo Perea Remujo, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba,

Alberto Quesada Molina, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICAN

Que el trabajo de Tesis titulado “Resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella enterica* de origen animal”, del que es autor el Licenciado en Veterinaria **Gonzalo Palomo Guijarro**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios de la Unidad de Microbiología del Departamento de Sanidad Animal en la Facultad de Veterinaria de Cáceres de la Universidad de Extremadura. Y reúne la calidad científica necesaria para ser presentado por el interesado con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de Extremadura.

Por ello, informamos favorablemente para que se proceda a su defensa,

En Cáceres, 20 de mayo de 2011

Segundo Píriz Durán

Anselmo Perea Remujo

Alberto Quesada Molina

"Cada descubrimiento, cada progreso, cada aumento de la riqueza de la humanidad, tiene su origen en el conjunto del trabajo manual y cerebral, pasado y presente. Entonces, ¿qué derecho asiste a nadie para apropiarse la menor partícula de ese inmenso todo y decir: «esto es mío y no vuestro»?"

P. Kropotkin (1842-1921)

Agradecimientos

Una beca de la Fundación Fernando Valhondo Calaff (Cáceres, 2007-2010), junto a los proyectos concedidos al grupo Microbiología e Inmunología Veterinarias de la Universidad de Extremadura por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-04147) y la Junta de Extremadura (PRI08B001), ha puesto la base financiera sobre la que se ha desarrollado esta investigación.

Pero, sobre todo, esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el concurso del personal de los distintos laboratorios que han colaborado en los proyectos de investigación. Las Unidades de Enfermedades Infecciosas de los Departamentos de Sanidad Animal de las Universidades de Extremadura, Complutense de Madrid y Córdoba aportaron las cepas sobre las que hemos trabajado. CEPsAVIAN (Córdoba), VISAVET (UCM, Madrid) y el Laboratorio Nacional de Referencia Salmonella-Shigella del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) se encargaron de concluir la caracterización de las salmonelas de la colección. Los Servicios de Microbiología de los hospitales del Sistema Extremeño de Salud: Ciudad de Coria, Virgen del Puerto (Plasencia), Campo Arañuelo (Navalmoral de la Mata), San Pedro de Alcántara (Cáceres), General de Llerena, Mérida y Perpetuo Socorro (Badajoz) cedieron sus aislados de *Salmonella* para el estudio comparativo con aquellos de origen animal.

El profesorado y demás personal de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, especialmente de las Unidades de Bioquímica y Microbiología: mis directores y colegas de laboratorio, han contribuido con su formación, asesoramiento, discusión y asistencia para que estos cuatro años hayan sido no sólo llevaderos sino los mejores de mi corta vida profesional.

El mérito de este trabajo se lo debemos a todas estas personas que me han sufrido durante los últimos cuatro años. Sirvan estas líneas como disculpa y como muestra de mi más sentido agradecimiento.

A quienes *me han sufrido*,
A mi familia y otros animales,
Salud y ánimos.

Resumen

La salmonelosis es la toxiinfección alimentaria de mayor relevancia para la salud pública en los países del Hemisferio Norte. Debido a su trascendencia clínica se han iniciado sendos planes de control de *Salmonella enterica* en Europa que, comenzando en avicultura, se espera pronto se extiendan a las explotaciones de porcino españolas. De manera paralela, las resistencias a los medicamentos se han convertido en uno de los principales retos sanitarios del siglo XXI. El conocimiento y control de este fenómeno en las enterobacterias, entre las que destacan las salmonelas, podría ser clave para atajar la preocupante pérdida de efectividad de los antimicrobianos.

Mediante la caracterización fenotípica y genotípica de los principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos de uso más extendido en medicina humana y veterinaria -especialmente a quinolonas y cefalosporinas- de bacterias aisladas de las más diversas especies animales de distintos regímenes de manejo se ha valorado la relevancia de las distintas serovariedades, fagotipos y estirpes de “*S. enterica*” estudiados para la generación y dispersión de las antibiorresistencias.

Las relaciones clonales (PFGE) entre las distintas cepas han confirmado el consabido contraste entre la gran diversidad genética de ciertas serovariedades como Typhimurium frente a la homogeneidad de otras como Enteritidis. Las primeras bacterias, asociadas mayormente al ganado porcino, se mostraron especialmente resistentes (CMI) a los antimicrobianos ensayados más antiguos entre los que se incluyen la ampicilina, la estreptomycinina, la tetraciclina y las sulfamidas que, junto al cloranfenicol, son indicadores de la presencia de elementos génicos mobilizables como los muy prevalentes y diversos integrones de tipo 1. Dichos integrones, al igual que ciertos serotipos y fagotipos, se presentan asociados al ganado porcino, tanto blanco/intensivo como ibérico/extensivo, pero raramente encontramos semejanzas a estos niveles entre ambos troncos raciales o sistemas de producción. La fauna silvestre desempeña un importante papel en la diseminación entre los distintos hospedadores tanto de estos como de otros mecanismos de resistencia típicos de las salmonelas.

La resistencia frente a las quinolonas se ha limitado básicamente a estirpes de origen avícola y a aquellas cepas de *S. Typhimurium* más multirresistentes -no así las provenientes

de porcino ibérico- que además mostraron cierta pérdida de sensibilidad a las cefalosporinas. Tanto en un caso como en otro se han detectado unos pocos mecanismos responsables en distinta medida de los niveles de antibiorresistencia. Tan sólo se han hallado, gracias a la PCR y posterior secuenciación, variantes alélicas asociadas indudablemente a la resistencia, tanto a ácido nalidíxico como a fluoroquinolonas, en las QRDR de *gyrA*: D87Y, S83F, D87N y, sobre todo, S83Y. Sin embargo, no se puede decir lo mismo de las únicas beta-lactamasas detectadas -más allá de la PSE codificada en un perfil de integrón concreto-: TEM y OXA. Pues, aunque se observan relaciones estadísticamente significativas de ambas enzimas en cuanto a su influencia en la pérdida de sensibilidad a algunas cefalosporinas, la literatura consultada nos hace pensar que esta resistencia se pudiera deber a otros mecanismos subyacentes por lo que harían falta ensayos más concluyentes.

Abstract

Salmonellosis is the most important food-borne disease in countries of the North Hemisphere. Because of its public-health importance, a number of programs in Europe have started to control *Salmonella enterica* which, beginning in poultry, soon would be implemented in Spanish swine farms. At the same time, drug-resistance has become one of the first health concerns for the 21st century. The knowledge and control of this phenomenon in enterobacteria -especially *Salmonella*- could be the clue to stop the loss of effectivity of antimicrobial treatments.

Phenotypic and genetic description of the main resistance mechanisms to quinolones and cephalosporins -antibiotics that are widely used in human and veterinary medicine- in *S. enterica* strains isolated from different bred-animal species allowed us to evaluate the importance of the serovars, phagotypes and clonal relationships for the spread of antimicrobial resistance.

Clonal relationships (PFGE) confirmed the contrast between serovars Typhimurium and Enteritidis, sharing high and low genetic diversity, respectively. *S. Typhimurium* isolates, mainly associated to swine, were more resistant to more primitively used antibiotics like ampicillin, streptomycin, tetracycline and sulfamides which, as well as chloramphenicol, indicate the presence of class 1 integrons as mobilizable genetic elements. Certain integrons were found associated to particular phagotypes and white or iberian swine as host animals. Beside this, it is suggested that wildlife plays an important role in the dissemination of those and others typical resistant mechanism of *Salmonella*.

Quinolone resistance was practically confined to isolates from birds and to some multidrug resistance *S. Typhimurium* strains -not from iberian swine- which also showed cephalosporins-sensibility loss. In both cases, there were variable roles of the different antimicrobial resistance mechanisms. Mutations at the quinolone resistance determinant region of *gyrA* gene evidenced the involvement of D87Y, D87N, S83F and, over all, S83Y alleles on nalidixic acid and fluoroquinolone resistance. However, cephalosporin resistance was mediated only in part by the two unique beta-lactamases found among the *Salmonella* isolates, which were OXA and TEM. Thus, other resistance mechanisms might there exist and their study would require future research.

Índice

I. Índices y abreviaturas

II. Trabajo de tesis

1. Introducción	1
1.1. La salmonelosis: una toxiinfección alimentaria de control prioritario.	1
1.2. El agente etiológico y su taxonomía.	4
1.3. Aspectos epidemiológicos y patológicos.	6
1.4. Diagnóstico.	10
1.5. Resistencias a los antimicrobianos.	10
1.5.1. Mecanismos de acción de los antimicrobianos.	15
1.5.2. Mecanismos de resistencia.	17
1.5.3. Transmisión horizontal.	22
2. Planteamiento y objetivos	25
3. Material y métodos	27
3.1. Material biológico: Transporte, cultivo y conservación.	27
3.2. Estudio de las relaciones clonales: electroforesis de campo pulsado.	29
Estudio fenotípico.	33
3.3. Sensibilidad antimicrobiana: la concentración mínima inhibitoria.	32
3.3.1. El método de la microdilución en medio.	33
3.4. Actividad beta-lactamasa.	37
3.4.1. Prueba cualitativa en placa.	37
3.4.2. Cuantificación.	37
3.5. Determinación de las enzimas beta-lactamasas: el isoelectroenfoque.	41
Estudio genotípico	42
3.6. Extracción y cuantificación del ADN.	42
3.7. Detección y caracterización de los integrones.	44

3.8. Genotipo de las beta-lactamasas.	47
3.9. Determinantes de resistencia para las quinolonas.	49
3.10. Tratamiento estadístico de los datos.	51
4. Resultados	53
4.1. Cepario.	53
4.1.1. Dispersión clonal.	55
4.2. Fenotipo de resistencia.	59
4.2.1. En función de la especie de aislamiento.	59
4.2.2. Por serovariedades, fagotipos y pulsotipos.	61
4.2.3. Resistencia fenotípica en relación al sistema de explotación.	65
4.2.4. Multirresistencia y perfiles de resistencia.	67
4.2.5. Actividad beta-lactamasa.	72
4.3. Genotipo de resistencia.	77
4.3.1. Integrones.	78
4.3.2. Determinantes de quinolonas.	86
5. Discusión	91
5.1. Cepario.	91
5.1.1. Serotipos.	91
5.1.2. Fagotipos.	93
5.1.3. Pulsotipos.	95
5.2. Fenotipos de resistencia.	97
5.2.1. En función de la especie de origen.	101
5.2.2. Por serovariedades, fagotipos y pulsotipos.	104
5.2.3. En función del sistema de explotación.	106
5.2.4. Multirresistencia y perfiles de resistencia.	109
5.2.5. Actividad beta-lactamasa.	113

5.3. Genotipos de resistencia.	115
5.3.1. Integrones.	115
5.3.2. Determinantes de resistencia frente a las cefalosporinas.	118
5.3.3. Determinantes de resistencia frente a las quinolonas.	121
6. Conclusiones	125
7. Perspectivas	127
8. Bibliografía	129
III. Anexos	173
Caracterización del cepario	175
Dendogramas (PFGE)	178
Concentración mínima inhibitoria (CMI)	184

Índice de tablas

1. Introducción	
1.1. Serovariedades asociadas a cada tipo de hospedador.	6
1.2. Cuadros clínicos más habituales producidos por <i>Salmonella enterica</i> .	9
1.3. Claves para la clasificación de las bacterias con actividad beta-lactamasa.	19
1.4. Determinantes de resistencia en <i>S. enterica</i> no tifoidea.	24
2. Planteamiento y objetivos	
3. Material y métodos	
3.1. Disolventes y diluyentes necesarios para la preparación de las microdiluciones.	34
3.2. Integrones y casetes: Genes, cebadores y tamaño de las secuencias amplificadas.	45
3.3. Beta-lactamasas: Genes con sus respectivos cebadores y el amplicón resultante.	48
3.4. Mezcla de PCR para la reacción múltiple de <i>bla</i> CTX-M.	49
3.5. Quinolonas: Genes, cebadores, amplicones y referencias para las PCRs.	50
4. Resultados	
4.1. Número de aislados de cada uno de los sistemas de cría contemplados.	53
4.2. Frecuencia de presentación de las distintas serovariedades en función de la especie hospedadora.	54
4.3. Frecuencia de presentación de los distintos fagotipos.	55
4.4. Cepas de mismo pulstipo aisladas de dos hospedadores al menos.	57
4.5. Perfiles de resistencia obtenidos tras los ensayos de susceptibilidad frente a 23 antimicrobianos.	68
4.6. Cepas con el perfil de pentarresistencia AMP-CHL-STR-SUL-TET.	71
4.7. Caracterización cualitativa de la actividad beta-lactamasa.	73
4.8. Rangos para los valores de CMI con variable de agrupación TEM.	76
4.9. Rangos para los valores de CMI con variable de agrupación OXA.	77

4.10. Casetes génicos asociados a <i>int1</i> identificados.	81
4.11. Distribución de la pentarresistencia según el genotipo definido por las casetes génicas asociadas a <i>int1</i> .	82
4.12. Distribución de los casetes génicos asociados a <i>int1</i> entre fenotipos, genotipos y origen de los aislados.	84
4.13. Número de cepas positivas o negativas a la PCR de <i>bla</i> TEM en función de los tipos de perfil de los integrones de tipo 1.	86
4.14. Determinantes de resistencia a quinolonas en los aislados ensayados.	87
4.15. Prueba no paramétrica de la mediana para las cepas que presentaron los distintos genotipos de QRDR de <i>gyrA</i> y <i>parC</i> .	88
4.16. Variabilidad de las medias de CMI (mg/L) para las distintas quinolonas por el efecto de la mutación T57S de <i>parC</i> (prueba T).	89
4.17. Variabilidad de las medias de CMI (mg/L) para las distintas quinolonas por el efecto de las mutaciones en las QRDR de <i>gyrA</i> (prueba T).	89
5. Discusión	
5.1. Cepas resistentes a florfenicol de este trabajo.	98
5.2. Resistencia frente a los antimicrobianos entre los aislados de <i>Salmonella</i> procedentes del cerdo ibérico de este trabajo, de porcino en España y máximas de Europa según la EFSA (2010a) para el año 2007.	103
5.3. Recuento de cepas no aisladas de cerdo blanco en función del grado de intensificación.	108
5.4. Asociación de la pentarresistencia a la resistencia frente a quinolonas y/o cefalosporinas.	111
5.5. Resumen de las cepas analizadas en este trabajo que presentan nuevas combinaciones de características genotípicas y fenotípicas.	121

Índice de figuras

1. Introducción	
1.1. Casos de salmonelosis por cada 100.000 habitantes notificados en los países de la Unión Europea (EU) desde 2004 (EFSA, 2009a, p. 25).	3
1.2. Prevalencia de los distintos serotipos de <i>S. enterica</i> en muestras obtenidas de lotes de gallinas en los estados miembros de la UE (EFSA, 2010a).	4
1.3. Representación del efecto del antimicrobiano para la selección de cepas resistentes de la micropoblación expuesta y disminución de las tasas de resistencia cuando éste desaparece del medio (Martínez et al. 2007).	11
1.4. Años de inicio de la comercialización de los principales antimicrobianos y de la aparición de las respectivas resistencias (García, 2010).	13
1.5. Estructura del integrón de clase 1 (Mella et al. 2004).	22
1.6. Esquema de la estructura general de SGI1 (Levings et al. 2007).	23
2. Planteamiento y objetivos	
3. Material y métodos	
3.1. Distribución de las cepas por especies hospedadoras y Facultad de Veterinaria de origen.	27
3.2. Número de cepas aisladas entre 1997 y 2008 por cada Facultad de Veterinaria de origen.	28
4. Resultados	
4.1. Recuento de pulsotipos compartidos por distinto número de cepas.	56
4.2. Porcentaje de cepas resistentes a cada uno de los antimicrobianos ensayados.	60
4.3. Distribución de las distintas cepas de Salmonella en función de su CMI frente a la ampicilina, la amoxicilina y la amoxicilina-clavulanato.	61
4.4. Porcentaje de cepas de cada serotipo resistentes a los distintos antimicrobianos testados. No se incluyen las aisladas de cerdo blanco.	62
4.5. Porcentaje de cepas aisladas de cerdo blanco resistentes a los distintos antimicrobianos testados.	62
4.6. Rangos promedio de CMI para los diversos grados de intensificación, excluyendo cerdo blanco, según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis	66
4.7. Distribución de la resistencia múltiple entre los distintos serotipos.	67
4.8. Porcentaje de multirresistencia y número de perfiles de pentarresistencia de cada serotipo con más de cinco aislados.	69
4.9. Porcentaje de aislados de cerdo blanco para cada serovariedad con	70

resistencia a entre 8 y 19 antimicrobianos y que presentan perfil de pentarresistencia.

4.10. Actividad beta-lactamasa de las cepas resistentes a cefalosporinas y positivas al test cualitativo. 75

4.11. Distribución de integrones detectados en serotipos aislados de las diversas especies animales excepto del cerdo blanco. 78

4.12. Expresión de la multirresistencia en función del serotipo entre cepas portadoras de *int1*. 79

4.13. Amplificación de casetes génicas asociadas a *int1*. 80

4.14. Análisis mediante RFLP de las casetes génicas. 81

4.15. Rangos promedio de CMI para las distintas mutaciones de *gyrA* y *parC* según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. 88

5. Discusión

5.1. Distribución de serotipos mayoritarios (n>5) en la colección de cepas de *Salmonella*. 92

5.2. Integrones de tipo 1 en una disposición clásica de la SGI1 (Quinn, 2006). 116

Abreviaturas

Organizaciones

ATCC. "American Type Culture Collection", en el inglés original (Colección Americana de Cultivos Tipo).

EFSA. "European Food Safety Authority", en el inglés original (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).

EUCAST. "European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing", en el inglés original (Comité Europeo sobre Sensibilidad a los Antimicrobianos).

ESCMID. "European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases", en el inglés original (Asociación Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas).

NCCLS. "National Committee for Clinical Laboratory Standards (as of 2005: CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute)", en el inglés original

WHO. "World Health Organization", en el inglés original (Organización Mundial de la Salud, OMS).

General

bp. "Base pair(s)", en el inglés original, o pares de bases.

CMI. Concentración Mínima Inhibitoria.

°C. Grados centígrados.

DNA. "Deoxyribonucleic acid", en el inglés original (ácido desoxirribonucleico ó ADN).

EDTA. "Ethylenediaminetetraacetic acid", en el inglés original.

DT. "Definitive Type", en el inglés original (fagotipo).

LB. Medio Luria-Bertani (medio de cultivo).

min. Minutos (también ').

PT. Del inglés "phagotype" (fagotipo).

UI. Unidades Internacionales.

Kb. Kilobase(s).

P. Probabilidad.

PCR. "Polymerase chain reaction", en el inglés original (reacción en cadena de la polimerasa).

PFGE. "Pulsed-field gel electrophoresis", en el inglés original (electroforesis en campo pulsado).

RNA. "Ribonucleic acid", en el inglés original (ácido ribonucleico ó ARN).

s. Segundo, también ".

sp./spp. Especie/especies.

STE. Tampón Salino ("Sodium Chloride, Tris, EDTA").

TE. Tampón Tris-EDTA.

TSA. Agar de triptona y soja.

U. Unit(s).

V. Volumen.

Antimicrobianos

(Según las normas de publicación de Journal of Antimicrobial Chemotherapy: JAC).

AMP.	Ampicilina.
AMX.	Amoxicilina.
AMC.	Amoxicilina+clavulanato.
CHL.	Cloranfenicol.
FLR.	Florfenicol.
SPT.	Espectinomicina.
STR.	Estreptomicina.
APR.	Apramicina.
GEN.	Gentamicina.
NEO.	Neomicina.
KAN.	Kanamicina.
TET.	Tetraciclina.
SUL.	Sulfametoxazol.
TMP.	Trimetoprim.
SXT.	Sulfametoxazol+trimetoprim.
CEF.	Cefalotina.
XNL.	Ceftiofur.
CAZ.	Ceftazidima.
CTX.	Cefotaxima.
CFQ.	Cefquinoma.
NAL.	Ácido nalidíxico.
ENR.	Enrofloxacina.
CIP.	Ciprofloxacina.
ACSSuT.	Pentarresistencia: AMP-CHL-STR-SUL-TET.
AMR.	Antimicrobial resistance.
MDR.	Multidrug resistance.

1. Introducción

1.1. La salmonelosis: una toxiinfección alimentaria de control prioritario

La salmonelosis es la denominación genérica con la que conocemos los procesos producidos por bacterias del género *Salmonella*, adquiriendo en algunos casos nombres específicos como fiebres tifoideas y paratíficas humanas, aborto paratífico de las ovejas o pullorosis aviar. En humana puede presentar diversos cuadros patológicos: fiebre tifoidea, infecciones localizadas, septicemias y más frecuentemente procesos gastroentéricos (Rodríguez-Ferri et al. 1999).

En los países más desarrollados la salmonelosis humana es una zoonosis cuya patogenia más habitual es la gastrointestinal mientras que en los países en desarrollo son más habituales las formas infectocontagiosas tifus/paratifus, o fiebre tifoidea/paratifoidea (producida por las serovariedades Typhi y Paratyphi, respectivamente, específicas del ser humano). A principios de la década de 1990, el tifus causaba 16,6 millones de casos anuales con una mortalidad del 3,6% y, aunque su incidencia aumentó hasta 21,7 millones de casos estimados, su letalidad disminuyó al 1% en 2000. Paralelamente, la incidencia de la salmonelosis no tifoidea se vio incrementada en el conjunto de países a finales del siglo pasado, causando en el periodo mencionado una media de 1.300 millones de episodios clínicos anuales, de los cuales 3 millones (0,23%) acabaron con la vida del paciente (Crump et al. 2010; Pang et al. 1995).

En la actualidad se trata de una de las más importantes toxiinfecciones alimentarias mundiales con 93,8 millones de casos estimados anualmente, de los cuales 155.000 supondrían la muerte del paciente (Majowicz, 2010). En Europa se ha producido una tendencia a la baja (Figura 1.1) desde los 73 casos confirmados/100.000 habitantes en 2000 a los 26,4 de 2008 según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, en el inglés original, 2010a), si bien hay autores que consideran mayor la incidencia real de la enfermedad al no declararse normalmente los episodios leves, de modo que elevan la razón a 450 casos por cada 100.000 habitantes en la UE, con una letalidad del 0,1% en el año 2000 (Quiles y

Hevia, 2006).

En España también se observa esta disminución de la prevalencia anual después de una tendencia alcista hasta 2003, habiéndose declarado 8,5 casos por cada 100.000 habitantes en 2008. Cifras algo mayores en Extremadura, donde en el año 2007 se declararon 320 casos de salmonelosis lo cual supone un 25,4% del total de casos de gastroenteritis registradas por el Servicio de Información Microbiológica y una tasa de 29 casos por cada 100.000 habitantes (Dependencia, 2009).

En la UE, además de los 90 millones de euros anuales de costes sociosanitarios (dos millones en España) derivados de la salmonelosis humana, la trascendencia de esta enfermedad en nuestras latitudes es más económico-sanitaria que clínica en lo que a la ganadería se refiere, al tratarse de una infección que causa pocos cuadros clínicos de relevancia epidemiológica (Tabla 1.2) pero sí importantes consecuencias para el comercio de animales y sus productos (Creus, 2010; Plym y Wierup, 2006).

Por todo lo anterior, la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) advirtió que los microorganismos del género *Salmonella*, junto a otros agentes patógenos infecciosos causantes todos de enfermedades gastrointestinales, son una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad mundiales (Schlundt et al. 2004). De hecho la Comisión Europea, en el marco de las estrategias recogidas en el Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria (CE, enero 2000), ha impulsado un primer plan transversal de control de las toxiinfecciones alimentarias, empezando por la salmonelosis. En ese sentido, la Directiva 2003/99 fija como objetivo prioritario la mejora de la bioseguridad y de la monitorización que deberá abarcar toda la cadena alimentaria: “desde la granja a la mesa”.

En el Hemisferio Norte, las principales fuentes de contagio al hombre son los diversos alimentos de origen animal de consumo habitual (huevos y carnes de ave, vacuno o cerdo), siendo *Salmonella* Enteritidis (58% de los casos confirmados en la UE en 2008) y *S. Typhimurium* (21,9%) los dos principales serotipos etiológicos (EFSA, 2010a).

Atrás quedaron las campañas de erradicación de *S. Gallinarium* y *S. Pullorum*

causantes de la tifoidea aviar y la pullorosis, respectivamente, que tantos quebraderos de cabeza causaron a los primeros avicultores intensivos (Hernandiz, 2007). En las últimas décadas, el nicho ecológico de ambas serovariedades ha sido ocupado por *S. Enteritidis* -presente en el 34,2% de los lotes de aves testados en 2008 en la UE como se observa en la figura 1.2 (EFSA, 2010a)- que, al tratarse de una bacteria zoonótica de transmisión transovárica, se ha convertido en la primera causa de salmonelosis no tifoidea debido al alto consumo europeo de ovoproductos (2,8% de estas muestras testadas en la UE en 2008 resultaron positivas a *Salmonella* spp.). Consecuentemente, los primeros programas de control de la salmonelosis auspiciados por la UE han sido dirigidos a la avicultura con un primer Reglamento 2160/2003 que desarrolla la directiva 2003/99 ya citada sobre vigilancia de zoonosis y agentes zoonóticos. Posteriormente, el Reglamento CE 1003/2005 fijó los objetivos de prevalencias para los cinco serotipos considerados prioritarios (Tabla 1.1) y, en este caso, para lotes de gallinas reproductoras. Fruto de aquel reglamento, en España comenzó el primer Programa Nacional de Control de la *Salmonella* en 2007 (reproductoras) incorporándose al programa del año siguiente los objetivos marcados por la Comisión sobre explotaciones avícolas de puesta y carne (Reglamento CE 1168/2006).

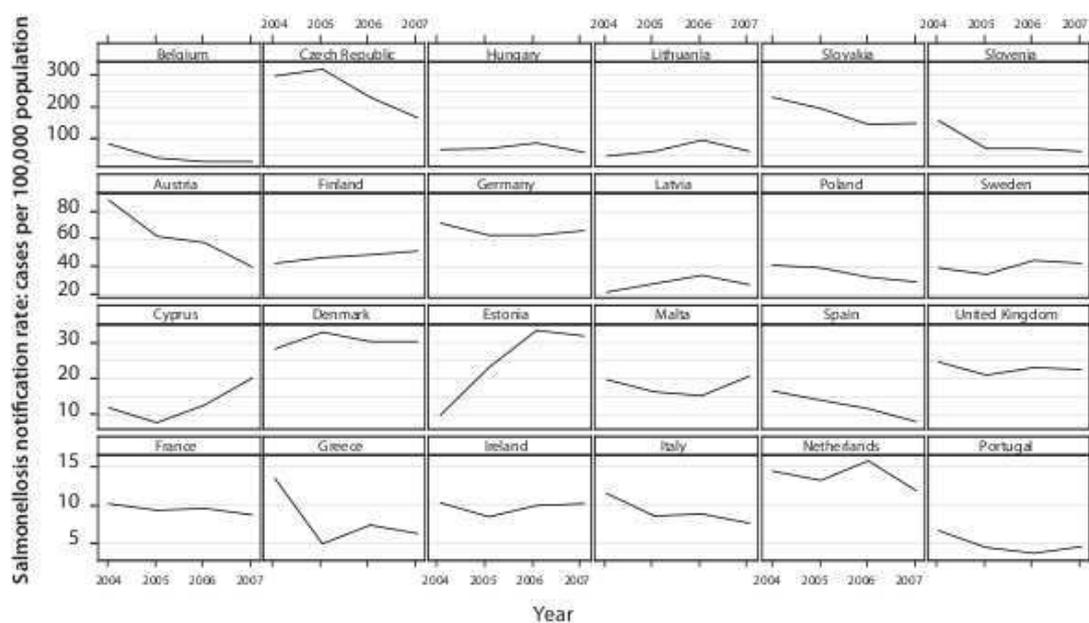


Figura. 1.1. Casos de salmonelosis por 100.000 habitantes notificados en los países de la Unión Europea (UE) desde 2004 (EFSA, 2009a, p.25).

Los programas destinados al ganado porcino serán los siguientes en ser implementados (se espera el Reglamento de la Comisión para este año tras los estudios de prevalencia dirigidos por la EFSA) máxime cuando *S. Typhimurium* está aumentando su importancia epidemiológica en la clínica humana: en 2006 los casos confirmados como *S. Typhimurium* en la UE fueron un 20,7% respecto a los de *S. Enteritidis*, mejorando la relación para el primer serovar a un 25,5% en 2007 y un 37,7% en 2008 (EFSA, 2009a y 2010a). De hecho, ya son nueve los países de la UE que han iniciado programas de control. Tras los escandinavos en 1995 (cerca de la calificación de exentos), se incorporaron a la carrera por la erradicación de *Salmonella* de la cabaña porcina Reino Unido y Alemania (2002), Irlanda (2003), Holanda (2005) y Bélgica (2007). La industria cárnica porcina española tiene un excedente de en torno al 40%, por lo tanto las restricciones a la importación a las que estos y otros estados se podrían acoger (Suecia y Finlandia ya desde su adhesión en 1995 tanto a carne fresca como a huevos) podrían suponer un serio problema para el sector nacional (Creus, 2010).

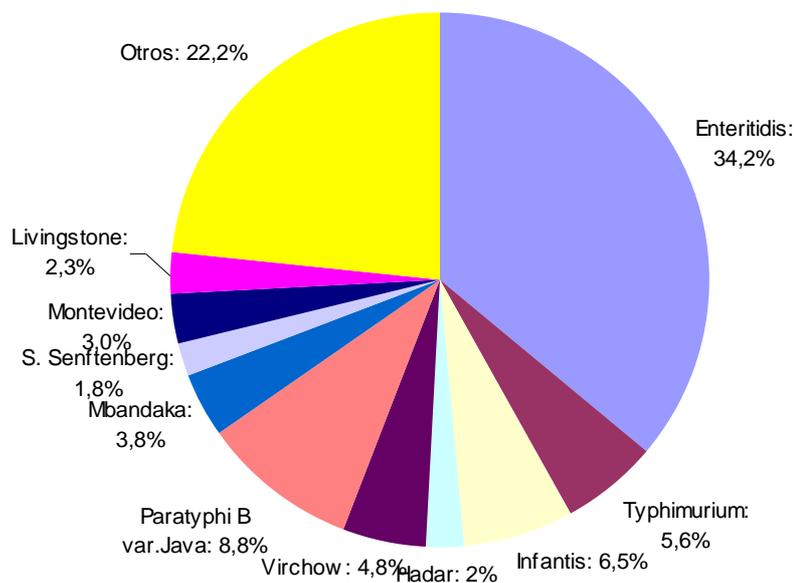


Figura 1.2. Prevalencia de los distintos serovares de *S. enterica* en muestras obtenidas de lotes de gallinas en los estados miembros de la Unión Europea (EFSA, 2010a).

1.2. El agente etiológico y su taxonomía

Según el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity et al. 2005), los microorganismos del género *Salmonella* (Genus XXXIII) conforman junto a otros 43 géneros la familia *Enterobacteriaceae*. Las salmonelas son bacilos cortos, gramnegativos, normalmente móviles, no esporulados, anaerobios facultativos, lactasa y oxidasa negativos. La mayor parte de los serotipos de interés clínico son sulfito-reductores y crecen en un amplio rango de temperaturas (desde 7 a 48° C), de pH (4 a 8) e incluso con una actividad de agua superior a 0,93. Estas características confieren a *Salmonella* una gran capacidad de resistencia (hasta 9 meses), llegando a multiplicarse en el medio (Old y Threlfall, 1998).

El género *Salmonella* se subdivide en dos especies *Salmonella bongori* (sin trascendencia clínica) y *Salmonella enterica*. Esta última especie, a su vez, engloba seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (V). De todas ellas, la más frecuentemente aislada y de mayor implicación para la salud pública es la subespecie I, o sea, *S. enterica enterica*.

Para profundizar más en la sistemática se puede analizar la composición antigénica de los aislados mediante seroaglutinación y clasificarlos, e identificarlos, en serogrupos y serotipos o serovariedades. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) utiliza el esquema de Kauffmann-White para describir los serotipos de *Salmonella* (Brenner et al. 2000; Le Minor, 1966; Poppof y Le Minor, 2001). Así la fórmula antigénica está dividida en tres partes de la siguiente forma: el antígeno somático, el antígeno flagelar de fase 1 y el antígeno flagelar de fase 2 (O:H1:H2). Los componentes de cada parte se separan por comas. El antígeno O se expresa por números arábigos, el H1 por las letras de la *a* a la *z*, con excepción de la *j*. Los antígenos posteriores a la letra *z* se indican con un número en subíndice del 1 al 83. Los antígenos H2 se expresan por números del 1 al 12 y de las series *e* y *z*. Sin embargo, la mayor parte de las serovariedades más habituales tienen nombre propio. Sería el caso de *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium* de forma abreviada) del serogrupo 4 (B) con fórmula 4,12:i:1,2 o *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), serogrupo 9 (D) 9, 12: g, m:-.

Actualmente hay descritos más de 2.500 serotipos (Bell et al. 2011), algunos de los cuales, como Typhi, Paratyphi B, Typhimurium, Hadar, Enteritidis y Virchow, pueden ser fagotipados en función de su especificidad serovar-bacteriófago.

1.3. Aspectos epidemiológicos y patológicos.

El principal reservorio de las bacterias del género *Salmonella* es el intestino de los animales homeotermos y poiquilotermos, sean domésticos, de compañía o silvestres. Colonizan indistintamente a mamíferos, anfibios, reptiles, aves o insectos. La gran mayoría de los animales son portadores asintomáticos, que liberan salmonelas en el medio ambiente a través de las heces. Sin embargo, no todas las serovariedades infectan cualquier especie. Tal como se puede observar en la tabla 1.1, hay serovariedades **específicas** de especie como sería el caso de Abortusovis (infecta al ganado ovino), Pullorum o Gallinarium (aves de corral); **adaptadas** a un hospedador pero no exclusivamente: Dublin en vacuno y Choleraesuis en porcino; o bien **ubicuas** que, aún con una mayor prevalencia en determinadas especies (*S. Typhimurium* en cerdo, *S. Enteritidis* en aves), serían las de mayor trascendencia para la salud pública de los países desarrollados en la línea de lo ya comentado anteriormente (Dominguez y Téllez, 2010).

Tabla 1.1. Serovariedades asociadas a cada tipo de hospedador (subrayadas las salmonelas zoonóticas objeto de planes de control comunitario) (Griffith et al. 2006; MARM, 2010; Domínguez y Téllez, 2010)

Hospedador/es	Serovariedades
Ser humano	Typhi, Paratyphi A y C, Sendai
Ser humano y/ aves indistintamente	Paratyphi B
Aves	Pullorum, Gallinarum
Ovino	Abortusovis
Porcino (ocasionalmente el hombre)	Choleraesuis, Essen, Bradenburg, 4,5,12:i:-, Derby, Agona, Heidelberg
Vacuno (ídem)	Dublin
Ubicuas	<u>Enteritidis</u> , <u>Typhimurium</u> , Anatum, Rissen, <u>Infantis</u> , <u>Hadar</u> y <u>Virchow</u>

La transmisión feco-oral de salmonelas vía alimentos se debe a la contaminación en las áreas de preparación y/o almacenamiento de los mismos. Si a esto le añadimos la

incorrecta temperatura en el almacenaje, una mala cocción, o la contaminación cruzada de alimentos listos para el consumo, las probabilidades de contagio aumentan. Como ya hemos dicho los alimentos más frecuentemente implicados en la transmisión de estas bacterias son los ovoproductos (transmisión transovárica del serotipo Enteritidis) seguidos por las carnes de cerdo y pollo (7,1 y 3,9%, respectivamente, de los brotes registrados por EFSA en 2008), aunque también se han descrito toxiinfecciones a través de la leche, el queso, el pescado, el marisco, los vegetales frescos, los zumos de fruta, las especias y el chocolate (Gómez et al. 1997).

En España, los serotipos Enteritidis (51%) y Typhimurium (24%) fueron los más aislados -seguidos de lejos por *S. Hadar* (5%)- a partir de casos clínicos humanos entre los años 1997 y 2001 según el Laboratorio Nacional de Referencia Salmonella-Shigella (LNRSS, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid). En este periodo aparecieron nuevos serotipos causantes de toxiinfecciones como la variante monofásica de *S. Typhimurium*: 4,5,12:i:-. Además, el serotipo Enteritidis duplicó su frecuencia mientras que Typhimurium se mostró constante (Echeita et al. 2005).

En Extremadura, gracias al proyecto de investigación del que resulta esta tesis doctoral, sabemos que el 43% de los aislados clínicos humanos fueron *S. Typhimurium* frente a un 39% de *S. Enteritidis* en los años 2007-2008. Esta inusual predominancia del serovar Typhimurium sobre Enteritidis, es objeto de análisis en la tesis doctoral de la compañera MJG Campos (2011).

En general, la mayor parte de los casos clínicos registrados son de niños de hasta 4 años, con unas tasas de incidencia tres veces superiores a los de entre 5 y 14 años y hasta nueve veces con el resto de grupos de edad. Se observa también un repunte de la casuística entre los ancianos de más de 65 años. La salmonelosis presenta cierta estacionalidad concentrada en los meses de verano. Estaría debida no sólo a las altas temperaturas sino también al mayor consumo de alimentos frescos o poco cocinados, pues más del 60% de las infecciones se adquieren en el hogar, reduciéndose a un 10% las asociadas a los viajes, tasas que llegan a invertirse en los países nórdicos (EFSA, 2009a).

Como ya hemos comentado la ruta más común en la transmisión de las salmonelas no tifoideas es la fecal/oral, aunque también pueden transmitirse a través de la mucosa conjuntival, de las vías respiratorias superiores y de las heridas. En el hombre la enfermedad puede presentar tres formas clínicas: cuadros sistémicos, infecciones localizadas y, la más frecuente, enteritis agudas (TFoZD, 2007).

Cronológicamente, la patogenia de la toxiinfección alimentaria puede dividirse en cuatro etapas: intestinal, secreción de fluido intestinal, extraintestinal y septicémica (Clarke and Gyles, 1993):

En la **fase intestinal** tiene lugar la proliferación de la bacteria en el lumen de las asas intestinales y comienza la invasión del epitelio de la mucosa. La infección por *Salmonella* es intracelular facultativa, mediada por un sistema de secreción tipo III localizado en la isla de patogenicidad 1 (SPI1), una de las más de 19 islas de patogenicidad descritas en el genoma de *Salmonella enterica*. Aunque penetra y se multiplica en células normalmente no fagocíticas, está descrita también su replicación en vacuolas -con bajo pH- de los macrófagos, gracias a un segundo sistema de secreción tipo III localizado en la isla de patogenicidad 2 (SPI2), hasta su apoptosis. De hecho los macrófagos juegan un importante papel en la bacteriemia de la infección. Posteriormente, la bacteria invade la lámina propia dando lugar a una reacción inflamatoria, caracterizada por la presencia de un elevado número de polimorfonucleares. Finalmente, se produce la trombosis de la lámina propia con la consecuente ulceración de la misma (Barrow et al, 2006; Clarke y Gyles, 1993; Cossart y Lecuit, 2000).

La **secreción del fluido intestinal** se produce como resultado de la reacción inflamatoria y de las proteínas del sistema de secreción tipo III lo que desembocará en un cuadro clínico de diarrea (Salyers y Whitt, 2002).

Por último, en la **fase extraintestinal** se produce la diseminación de la bacteria a los ganglios linfáticos mesentéricos a partir de los cuales alcanza la circulación sanguínea y el resto de la economía orgánica, especialmente bazo, hígado y órganos reproductivos. La **fase septicémica** de la enfermedad es más habitual en los serovares más específicos de hospedador. Aproximadamente un 2-5% de los casos gastroentéricos humanos desarrollan

bacteriemia (Barrow et al. 2010; Hohmann, 2001).

Tabla 1.2. Cuadros clínicos más habituales producidos por *Salmonella enterica* en animales no humanos (elaboración propia a partir de Gómez et al. 2009; Goyache y Briones, 2003; Griffith, 2006; Quinn, 1994).

Hospedador	Serotipos	Cuadros clínicos
Porcino	Choleraesuis	Septicémicos (similar peste porcina clásica), abortos, gastroenteritis
	Typhimurium	Gastroenteritis, neurológicos
	Typhisuis	Gastroenteritis crónica/intermitente
Aves	Pullorum	Pullorosis: enteritis
	Gallinarium	Tifosis: septicemia
	Arizonae	Enteritis y septicemia.
	Enteritidis y Typhimurium	Paratifosis: enteritis y septicemia. Muerte súbita (paloma)
Vacuno	Dublin	Subclínica, enteritis, septicemia, meningitis (terneros), aborto, osteomielitis, gangrena seca (terneros)
	Typhimurium y Bovismorbificans	Enteritis, septicemia
Ovino	Abortusovis, Montevideo, Dublin	Aborto
	Typhimurium, Anatum	Enteritis y septicemia
Equino	Abortusequi	Aborto,
	Typhimurium	Enteritis y septicemia
Reptiles	Arizonae, Houtenae	Subclínica, septicemia, muerte súbita

Con una incubación desde las 5-7 horas postinfección los síntomas de la salmonelosis varían desde la diarrea poco severa, que puede contener sangre, linfocitos y mucus, dolores abdominales, mialgias y a veces vómitos; hasta una grave enfermedad sistémica que puede provocar la muerte del paciente. En las personas lo más común es el desarrollo de gastroenteritis autolimitante que puede durar de 2 a 7 días. El tratamiento consiste en la incorporación de fluidos y electrolitos para evitar la deshidratación, generalmente no son utilizados antibióticos, excepto cuando se trata de personas inmunodeprimidas, mayores, niños o en los casos de salmonelosis sistémica. Los antimicrobianos de elección son ampicilina, cloranfenicol, y trimetoprim-sulfametoxazol. Cuando aparecen casos de resistencia a estos compuestos las fluoroquinolonas o las cefalosporinas de amplio espectro podrían ser necesarias. Por lo tanto, la resistencia a estos dos grupos de antimicrobianos son especialmente graves, tanto más a las cefalosporinas de amplio espectro, prescritas para el tratamiento de los niños (Burkhardt et al. 1997; Hohmann, 2001; McDermott, 2006; Rabsch et al. 2001).

En los animales, siendo lo más común los portadores asintomáticos, se observan más variedad de manifestaciones clínicas aunque normalmente con bajas tasas de letalidad: abortos (vacuno, ovino, équidos), enteritis en casi todas las especies, en cerdos se dan brotes septicémicos con similitudes a los de la peste porcina clásica y muerte súbita en aves y reptiles (Tabla 1.2) (Téllez, 2003).

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la salmonelosis requiere de una atenta observación de aspectos clínicos y epidemiológicos, dado el carácter multifactorial y la poca especificidad de la sintomatología que provoca. El diagnóstico asertivo se basa en la aplicación de técnicas laboratoriales específicas; el uso de medios de cultivo selectivos permite el aislamiento de las salmonelas. Entre ellos, cabe destacar el selenito verde brillante (SBG), la xilosina-desoxicolato (XLD), el Salmonella-Shigella (SS), el agar selenito verde brillante (SBGA), el medio de identificación cromogénica de *Salmonella* (SMID), el triple azúcar hierro (TSI) y el agar de lisina e hierro (LIA) (Goyache y Briones, 2006). El protocolo para el aislamiento a partir de muestras tomadas de animales sanos podría ser¹:

1. **Preenriquecimiento:** en agua de peptona tamponada, incubar a 37°C durante 18 horas.
2. **Enriquecimiento selectivo:** medio semisólido Rappaport Vassiliadis (MSRV). Incubar a 41°C 24 horas.
3. **Cultivo selectivo:** siembra por agotamiento en medios XLD o Verde brillante. MUCAP test: las colonias de salmonella son fluorescentes al ser expuestas a la luz ultravioleta junto con este reactivo. Pase a TSI y Rambach (cromogénico de Merck®).

1.5. Resistencias antimicrobianas

Desde el descubrimiento del efecto del primer antibiótico, la penicilina, por Alexander Fleming (1928), y la extensión de su uso durante la II Guerra Mundial, los antimicrobianos

¹ Basado en los protocolos del Centro de Producción y Sanidad Avícola de Andalucía (CEPSAVIAN), según recomendaciones del Laboratorio Comunitario de Referencia para *Salmonella* de Bilthoven (Holanda) sobre la norma ISO 6.579 (2002): “Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales en muestras a nivel de producción primaria”.

han supuesto, junto a la anestesia y las prácticas higiénicas sanitarias, una auténtica revolución de la sanidad.

Prácticamente a la vez que se generalizaba su uso en medicina humana, los antimicrobianos comenzaban a utilizarse en sanidad y producción animal. En 1951 ya se consumían en EEUU 110 toneladas para medicar piensos, aparte de las 580 toneladas destinadas al uso clínico, tanto humano como animal. Estas cantidades se multiplicaron por 50 y 10, respectivamente, en treinta años (Aarestrup, 2006). En 2001 se estima que el consumo de antimicrobianos de EEUU en piensos fue de 11.158 toneladas, dato muy superior a las 1.574 toneladas para idéntico fin declaradas por la Federación Europea para la Sanidad Animal que junto a las 3.463 toneladas destinadas a sanidad animal suman prácticamente la mitad del consumo de antimicrobianos en Europa en 1997 (Vidal, 2005).

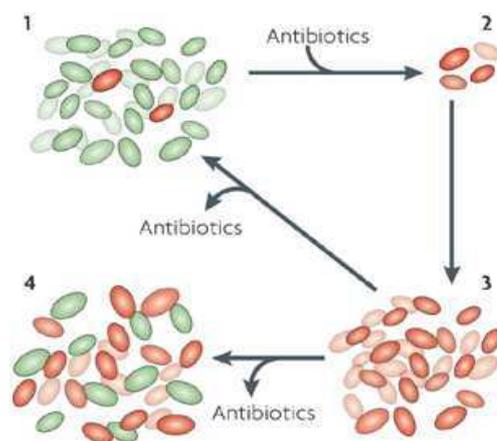


Figura 1.3. Representación del efecto del antimicrobiano para la selección de cepas resistentes de la micropoblación expuesta y disminución de las tasas de resistencia cuando éste desaparece del medio (Martínez et al. 2007).

Aparte de la posible toxicidad de algunos de estos compuestos, así como la presencia de residuos medicamentosos en los productos de origen animal, el mayor peligro para la salud pública es la aparición de resistencias bacterianas a los antimicrobianos de uso clínico. La introducción de estos compuestos antibacterianos en el ecosistema supone un factor de

selección que favorece el desarrollo de las cepas resistentes, de manera intrínseca o adquirida. Se establece lo que en biología evolutiva se denomina una “carrera de armamento” (Figura 1.3) de modo que continuamente hay que descubrir o crear nuevos antimicrobianos que sean eficaces contra las mismas infecciones.

Ya en 1969 el Informe Swann advertía de los riesgos a medio-largo plazo que acarrearía el uso indiscriminado de antimicrobianos. Posteriormente la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como numerosas instituciones, se ha hecho eco en sus foros y publicaciones de la trascendencia que tienen las resistencias antimicrobianas para la salud pública situándolas como uno de los principales retos sanitarios del siglo XXI (Smith et al. 2001). La situación clínica se ha tornado realmente preocupante en los últimos años con la aparición de bacterias para las que ya no hay tratamiento antimicrobiano conocido. Sería el caso de ciertos bacilos tuberculosos extremadamente resistentes (TB-XDR, del inglés original) o, en diverso grado, las llamadas “superbacterias” de las especies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* metil-resistente, MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. así como ciertas cepas y determinantes de resistencia (la epidemia de las beta-lactamasas CTX-M, por ejemplo) de la familia *Enterobacteriaceae* (Otal, 2010). De hecho, se estima que unas 25.000 personas mueren anualmente en Europa como consecuencia directa de las resistencias a los antimicrobianos (Baquero, 2010).

McDermott (2006), en una exhaustiva revisión bibliográfica sobre resistencias antimicrobianas en *Salmonella*, constata el incremento de cepas no ya sólo antibiorresistentes sino también multirresistentes (a cuatro o más antimicrobianos) en todos los países en los que se han realizado investigaciones al respecto. Soler et al. (2006) en un estudio sobre 5.777 salmonelas aisladas de casos clínicos humanos encontraron un 50% de resistencia al ácido nalidíxico en *S. Enteritidis* y un 74% de multirresistencia en *S. Typhimurium*. De esta serovariedad destaca el fagotipo DT104 -con la pentarresistencia característica a ampicilina, estreptomicina, cloranfenicol, sulfonamidas y tetraciclina- que se ha convertido en el más frecuentemente aislado en España.

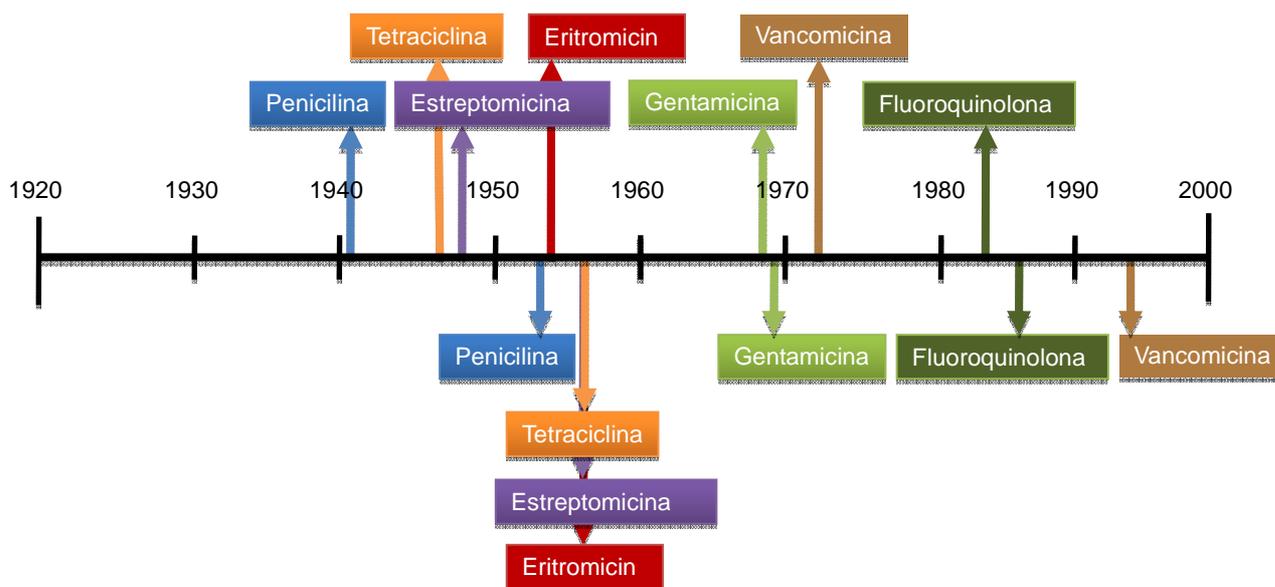


Figura 1.4. Años de inicio de la comercialización de los principales antimicrobianos y de la aparición de las respectivas resistencias (García, 2010).

Pese a no existir trabajos publicados específicos sobre la situación en Extremadura, estudios preliminares de sensibilidad antimicrobiana con difusión en disco frente a estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, florfenicol, espiramicina, sulfametoxazol y ampicilina de nuestro grupo de investigación realizado a partir de cepas de *Salmonella* spp. aisladas en los hospitales Campo Arañuelo, San Pedro de Alcántara y Perpetuo Socorro dan unos resultados de multirresistencia del 46% en Badajoz (35 cepas aisladas en 2001 y 2002), 63% en Cáceres (sobre 8 cepas aisladas en 2007) y 24% en Navalmoral de la Mata (95 cepas de 2004-2006) (Campos, 2007).

Las resistencias detectadas en las especies ganaderas son también preocupantes teniendo en cuenta que el contagio se da casi exclusivamente a partir de alimentos de origen animal. De hecho Valdezate et al. (2007) tras analizar 380 aislados de *Salmonella* spp. a partir de alimentos depositados en el Laboratorio Nacional de Referencia Salmonella-Shigella (Majadahonda, Madrid) arroja un 40,6% de resistencia al ácido nalidíxico en cepas de *S. Enteritidis* y un 71,7% de multirresistencia en *S. Typhimurium*. Usera et al. (2002) resaltan en un estudio similar, pero sobre aislados a partir de animales, el aumento de las resistencias entre 1996 y 2000 con altas tasas de multirresistencia en general pero sobre todo en aislados a partir del ganado porcino. De los serovares destacan la alta multirresistencia de Typhimurium (80,8%) y su variante monofásica 4,5,12:i:- (90%) así como la preeminencia entre los

patrones de resistencia de la pentaresistencia (AMP, STR, CHL, TET, SUL) bien sola (41,3%) o con otros antimicrobianos (53,8%). Además no sólo asociado dicho patrón a los fagotipos habituales de *S. Typhimurium* DT 104 y DT 104b sino también en DT U302.

En otras especies la situación no es más halagüeña. Así, Capita et al. (2007) encontraron un 40% de cepas multirresistentes y tasas de resistencia a la ciprofloxacina mayores de un 20% en *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en un estudio sobre muestras de pollo en mataderos del noroeste peninsular. Unos años antes, Usera et al. (2002) obtuvieron resultados algo más discretos con una resistencia a ácido nalidíxico del 23,3% en aislados de avicultura y casi total sensibilidad a la ciprofloxacina, nada sorprendente si tenemos en cuenta que habían comenzado a utilizarse las fluoroquinolonas en ganadería apenas dos años antes del último muestreo (2000). Estas elevadas tasas de resistencia a quinolonas en salmonelas aisladas de aves y otros animales de abasto han sido también descritas y son causa de un mayor control sobre su uso tanto en EEUU como en la Unión Europea en la última década. En general, las evidencias de que el sobreuso de antimicrobianos en producción animal (bien de manera terapéutica, profiláctica o como promotores del crecimiento) repercute a la larga en la salud pública llevaron a limitar paulatinamente su utilización, incluso hasta una total prohibición como sería el caso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento en la Unión Europea desde enero de 2006 (Bager y Helmuth, 2001; de Jong, 2009; Lestari et al. 2009; Moreno, 2008).

La directiva europea 2003/99/EC establece las líneas generales para la monitorización de la resistencia a los antimicrobianos. En este sentido, en el año 2006, la UE solicitó a la EFSA (Parma, Italia) que elaborase un informe donde se detallaran las vías para armonizar, en los diferentes países miembros, los mecanismos de seguimiento y control de las antibioresistencias en microorganismos de los géneros *Salmonella* y *Campylobacter*. Fruto de este trabajo han sido las decisiones de la Comisión Europea 2007/407/EC y 2007/516/EC, para el establecimiento de una monitorización armonizada de las resistencias en *Salmonella* de cerdo y aves, y para financiar un estudio de prevalencias de la resistencia tanto de *Campylobacter* spp. como de *Samonella* spp. en mataderos de aves, respectivamente

Las más recientes directrices de diversos organismos recomiendan que las políticas

europeas se dirijan más hacia la investigación de las antibiorresistencias que hacia la síntesis de nuevos antimicrobianos (Vincentzen y Hope, 2006). Lo cual no parece estar en contradicción con la opinión de la industria farmacéutica en vista de la disminución de los recursos destinados a este tipo de medicamentos desde finales de la década de 1970. Para comercializar un antimicrobiano se requiere una inversión que puede superar los 300 millones de dólares estadounidenses en un periodo de 10 a 20 años. Si introducimos en la ecuación las antibiorresistencias presentes y futuras la rentabilidad de estos compuestos disminuye aún más, sobre todo si la comparamos a la de otros medicamentos como los dirigidos a combatir las emergentes enfermedades psicosociales (incluida la impotencia) de consumo creciente en países desarrollados. De hecho hace dos años se estaba investigando en cinco nuevas moléculas antimicrobianas que representaban el 1% del total de medicamentos en desarrollo, estimándose que en esta próxima década saldrán al mercado tan sólo uno o dos nuevos antimicrobianos (Baquero, 2010; Salyers y Whitt, 2002).

1.5.1 Mecanismos de acción de los antimicrobianos.

Antes de adentrarnos en los distintos mecanismos por los que las bacterias evitan o contrarrestan la actividad de los diversos compuestos de síntesis química (**quimioterápicos**) o biológicos (**antibióticos**) utilizados para su atenuación (**bacterioestáticos**) o inhibición (**bactericidas**) vamos a dibujar unas líneas generales sobre los modos de acción de estos **antimicrobianos**.

a. Inhibición de la síntesis de la pared celular o alteración de la permeabilidad de la membrana.

La pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas se diferencia por la espesa capa de peptidoglicano de las primeras. Dicha envuelta está constituida por multicapas de glicano, péptidos, y moléculas de ácido teicoico y teicurónico. La pared de las bacterias gramnegativas consiste en una fina capa de peptidoglicano rodeada por una segunda capa de lipopolisacáridos, lo que le confiere baja permeabilidad a los antimicrobianos.

Para que se forme la pared celular se requiere la síntesis en el citoplasma de las unidades estructurales de peptidoglicano, que es un pentapéptido de muramil. Sigue el enlace del pentapéptido de muramil con la superficie citoplasmática de la membrana celular y su pase para la fase externa a través de dos intermediarios lipídicos. Esta fase ocurre en la membrana. Por último, el glicano y el pentapéptido de muramil se enlazan extracitoplasmáticamente. Los antimicrobianos pueden inhibir la síntesis de la pared celular en cualquiera de las tres fases de su formación. Si bien los principales antimicrobianos utilizados actúan en la fase extracitoplasmática de la formación de la pared. Sería el caso de los beta-lactámicos y de los glicopéptidos.

Las polimixinas presentan un extremo liposoluble que se fija a los fosfolípidos de la membrana citoplasmática y un extremo hidrosoluble afín con la parte hidrófila. Provocan una alteración estructural de la membrana con su acción a modo de detergentes catiónicos.

b. Inhibidores de la síntesis proteica.

La síntesis proteica se inicia con la transcripción de ADN en ARN mensajero y termina con la traducción y translocación de las proteínas. La inhibición suele producirse durante la traducción. Los orgánulos responsables de la traducción son los ribosomas. Los organismos procariontes tienen un ribosoma 70S constituido por dos subunidades, la 30S y la 50S, compuestas a su vez por tres tipos diferentes de ARN ribosómico. Hay antimicrobianos que interfieren con la subunidad 30S (aminoglucósidos como la estreptomycin y la espectinomycin) y otros con la 50S (cloranfenicol y florfenicol). Los aminoglucósidos se unen irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma e interfieren bloqueando el complejo de iniciación (30S-ARNm-ARN transferente). También desaceleran la síntesis de proteínas que ya se ha iniciado y producen errores en la lectura del ARNm. Las tetraciclinas se unen reversiblemente a la subunidad 30S e impiden la unión del aminoacil-ARNt que transporta los aminoácidos al sitio-aceptor del ribosoma para producir la proteína.

c. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.

La inhibición de la síntesis y/o función de los ácidos nucleicos es fatal para la célula bacteriana porque impiden la replicación del ADN, la expresión génica y la síntesis proteica.

Las quinolonas, por ejemplo, impiden la síntesis del ADN a través de interacciones con la ADN girasa y la topoisomerasa IV, mientras la rifampicina actúa en la síntesis del ARN porque inhibe a la polimerasa del ARN.

d. Inhibidores metabólicos o antimetabolitos.

Se denominan antimetabolitos a ciertos compuestos estructuralmente similares a los metabolitos procariotas que pueden competir con éstos inhibiendo diversas rutas metabólicas. Las sulfonamidas (como el sulfametoxazol) debido a su similitud con el ácido aminobenzoico hacen que la enzima DHPS, responsable de la unión de éste con la pteridina, no intervenga en la ruta del ácido fólico lo que interfiere en última instancia en la síntesis de los ácidos nucleicos. De manera similar, el trimetoprim es análogo estructural del ácido fólico e inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa. Por separado tienen un efecto bacterioestático pero su utilización conjunta (trimetoprim+sulfonamida) resulta sinérgica y muy eficaz en la lucha antimicrobiana (Towner, 1995).

1.5.2 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Las bacterias pueden presentar **resistencia intrínseca** a los antimicrobianos, es decir, constitutiva por su metabolismo o estructura, o bien pueden **adquirirla**. También se considera **resistencia ambiental** a la condicionada por factores físico-químicos del medio donde se desenvuelve la bacteria. Por ejemplo, la capa mucopolisacárida típica de las películas bacterianas. Sobre los mecanismos para adquirir dichos determinantes de resistencia trataremos en el siguiente punto. Inicialmente describiremos las distintas estrategias de resistencia fenotípica y genotípica a los antimicrobianos.

a. Inactivación enzimática: beta-lactamasas y transferasas.

Este mecanismo consiste en la inhibición del antimicrobiano mediante la producción por parte de la bacteria de enzimas como las beta-lactamasas (que inactivan a los beta-lactámicos) y las transferasas (actúan contra los aminoglucósidos). Las beta-lactamasas hidrolizan el anillo beta-lactámico de estos antimicrobianos, quedando imposibilitados para unirse al sitio activo de la pared celular, o sea, las proteínas fijadoras de penicilinas (*penicillin binding proteins*, o PBP, en el inglés original), por lo que no podrán interferir en las

reacciones de transpeptidación de la síntesis de la pared. En las bacterias gramnegativas las beta-lactamasas se concentran en el espacio periplásmico, clasificándose en función del antimicrobiano sobre el que ejercen efecto (cefalosporinasas, cefuroximasas, beta-lactamasas de espectro extendido o BLEE y metalo-lactamasas), si les afectan o no los inhibidores beta-lactamámicos (ácido clavulánico o EDTA, por ejemplo) y por la ubicación de los genes que las codifican (*bla*) en el cromosoma o en elementos de transmisión horizontal como los plásmidos (por ejemplo las de tipo AmpC como CMY) (Blanco et al. 2006). Bush et al. (1995a) hicieron una clasificación funcional (cuatro grupos con subgrupos) basándose en el sustrato que hidrolizan, su tipo molecular (cuatro, de la A a la D) y la inhibición de su acción por el ácido clavulánico y el EDTA (Tabla 1.3). Se han descrito más de 400 beta-lactamasas distintas, entre las que se han detectado en *Salmonella* diversas variantes para CMY, OXA, PSE, TEM, CTX-M, ACC, DHA, KPC, CARB, PER y SHV (Li et al. 2007; Michael et al, 2006).

Las transferasas son responsables de la transferencia de grupos acetil (*N*-acetiltransferasas, genes *aac*; *O*-acetiltransferasas, genes *sat*), fosforil (*O*-fosfotransferasas, genes *aph* o *str*) o de un nucleótido a grupos hidroxil (*O*-adeniltransferasas codificadas por genes *aadA*) de la molécula del aminoglicósido. Esta alteración impide la unión del antimicrobiano a los ribosomas además de dificultar su penetración en la célula. Recientemente se ha descrito en *S. Enteritidis* una metilasa de ARNr 16S (gen *armA*) que confiere resistencia a prácticamente todos los aminoglicósidos excepto a la estreptomicina (Galimand et al. 2005). El grupo de trabajo de la EFSA para una monitorización estandarizada de las resistencias en *Salmonella* y *Campylobacter* recomienda incluir como mínimo en los estudios de CMI a la estreptomicina y a la gentamicina (Bronzwaer et al. 2008), ya que ambos son de uso ganadero y por tratarse, el primero de ellos, de un indicador de la pentarresistencia ya mencionada de *S. Typhimurium* DT104. Sin embargo, otros aminoglicósidos poco utilizados en clínica humana como neomicina o kanamicina, y por último la apramicina, sólo prescrita en sanidad animal, pueden servir como indicadores de la transferencia de la resistencia de los animales al hombre (Vidal, 2005).

Tabla 1.3. Claves para la clasificación de las bacterias con actividad beta-lactamasa (Bush et al. 1995a).

Grupo de Bush	Sustratos	Inhibición por ácido clavulánico	Inhibición por EDTA	Enzimas representativas	Clase molecular de Ambler
1	Cefalosporinas	-	-	AmpC, enzimas de Gram-negativos	C
2a	Penicilinas	+	-	Penicilinasas de Gram-positivos	A
2b	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SH-1	A
2be	Penicilinas, cefalosporinas de estrecho y amplio espectro, monobactams	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1	A
2br	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-36, TRC1	A
2c	Penicilinas, cloxacilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4	A
2d	Penicilinas, cloxacilina	+/-	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2	D
2e	Cefalosporinas	+	-	<i>Proteus vulgaris</i> -cefalosporinasa inducible	A
2f	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenems	+	-	NMC-A, SME-1	A
3	Mayoría de β -lactámicos incluyendo carbapenems	-	+	<i>Xanthomonas maltophilia</i> L, <i>Aeromonas hydrophila</i>	B
4	Penicilinas	-	?	<i>Burkholderia cepacia</i> penicilinasas	?

También se han descrito acetiltransferasas específicas de cloranfenicol codificadas por diversas variantes alélicas de los genes *catA* y *catB*, este último asociado a integrones de tipo 1 (Michael et al. 2006). Por último, un caso peculiar es el de la acetiltransferasa codificada por el gen asociado a plásmidos *aac(6')-Ib* que al mutar (*cr*) sustituye dos aminoácidos (W102R y D179Y) pasando a tener actividad no sólo frente a aminoglicósidos sino también contra la ciprofloxacina (Bronzwaer et al. 2008).

b. Alteraciones en la acumulación intracelular.

Para disminuir la concentración intracelular de los antimicrobianos las bacterias pueden disminuir su incorporación al citoplasma o bien aumentar su expulsión al exterior. Para ello se generan mecanismos activos para expulsar los compuestos de su citoplasma (bombas de eflujo) o simplemente se alteran los mecanismos de transporte y la permeabilidad de su membrana.

En las bacterias Gram-negativas las sustancias hidrofílicas penetran la célula bacteriana a través de porinas, mientras que las sustancias hidrofóbicas deben difundir en la pared celular para llegar al interior de la célula. Algunas bacterias tienen naturalmente una menor permeabilidad, lo que significa que van a tener una mayor resistencia a los antimicrobianos, pero si además ocurren mutaciones que conllevan la reducción en el número de porinas, disminución del tamaño de sus poros o disminución de su expresión, se originan liberos incrementos de la resistencia adquirida a los antimicrobianos (Guardabassi y Courvalin, 2006).

La especificidad de las bombas de eflujo es muy variable. Las SDC (*specific drug resistance*, del inglés original) son específicas para determinadas sustancias, como las tetraciclinas o el cloranfenicol/florfenicol, mientras que otras, denominadas bombas MDR (*multidrug resistance*, del inglés original), son activas para una gran variedad de moléculas, como sería el caso de las bombas AcrAB, con gran implicación en la resistencia frente a las fluoroquinolonas (McDermott, 2006). Los genes responsables de las primeras se encuentran habitualmente en elementos móviles y por lo tanto son más susceptibles de la transmisión horizontal, mientras que las segundas suelen estar codificadas en el cromosoma y se transmiten verticalmente (Butaye et al. 2003). Tan sólo 6 de los 35 genes que codifican las bombas de eflujo específicas de tetraciclinas han sido descritos en *Salmonella*: *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetG* y *tetH*; de los cuales el primero está asociado al elemento SGI1 (ver 1.4.3). En cuanto a los fenicoles se debe mencionar el papel de bombas específicas para cloranfenicol (gen *cmlA*) y de otras compatibles a la vez para florfenicol (*floR*). Mientras que las primeras apenas ha sido descritas en unas pocas serovariedades de *Salmonella*, el gen *floR* está asociado a fenómenos de multirresistencia de múltiples serotipos (Typhimurium, Albany, Newport, Agona, Kiambo) quizás por su ubicación en el elemento génico movilizable SGI1 y en plásmidos (Alcaine et al. 2007). Recientemente se ha descrito QepA en *Salmonella*, una SDC para fluoquinolonas asociada a plásmidos (Bim Kin, 2009).

c. Cambios y protección en la diana

Cuando ocurren cambios en la diana o punto de actuación del antimicrobiano, éste no puede ejercer su efecto en la célula. Los cambios en la diana están asociados a fenómenos de resistencia para casi todos los antimicrobianos, pero desde el punto de vista clínico este

mecanismo es más importante para penicilinas, glicopéptidos, macrólidos, lincosamidas y estreptograminas, en las bacterias gramnegativas, y para quinolonas en bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas (Guardabassi y Courvalin, 2006).

Las mutaciones en los genes que codifican las subunidades de la ADN girasa o topoisomerasa II (*gyrA* y *gyrB*) o de la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) producen una disminución acusada de la sensibilidad al ácido nalidíxico y bastante menor a las fluoroquinolonas (en nuestro estudio enrofloxacina y ciprofloxacina). En el caso del gen *gyrA* las mutaciones que implican cambios en los codones suelen darse entre los aminoácidos 67 y 106, por lo que esta región se denomina QRDR (*Quinolone Resistance Determinant Region*, del inglés original). Se ha descrito un aumento notable de la CMI para quinolonas, tanto fluoradas como no, cuando se da una doble mutación en *gyrA* (Michael et al. 2006). La resistencia a las sulfamidas también está mediada por un mecanismo similar. Las tres variantes alélicas del gen *sul* (normalmente asociado a SGI1 e integrones de tipo 1) codifican una proteína análoga a la DHPS con mayor afinidad por el ácido aminobenzoico que por la sulfonamida, es lo que se llama un bypass metabólico (Towner, 1995). También contra el trimetoprim las bacterias han generado un mecanismo de resistencia similar: el gen *dhfr* o *dhfr* codifica una dihidrofolato reductasa (DHFR) que sirve como sustrato alternativo al antimicrobiano. A diferencia de las mutaciones que afectan la estructura/función de las topoisomerasas II y IV, estos otros determinantes de resistencia (genes *sul* y *dhfr*) se pueden transmitir mediante mecanismos de transmisión horizontal (Michael et al. 2006).

La protección celular de la diana donde actúa el antimicrobiano es otra forma de los microorganismos para mostrar resistencias a determinados antimicrobianos. Las moléculas a las cuales las bacterias son resistentes debido a la protección de la diana son las tetraciclinas y las quinolonas (Guardabassi and Courvalin, 2006). Las proteínas protectoras de los ribosomas (RPP) intervienen en la resistencia a las tetraciclinas, un mecanismo que no ha sido detectado aún en *Salmonella* (Alcayne et al. 2007; Connell et al. 2003). Sí que han tomado relevancia en los últimos años las proteínas Qnr, que de alguna manera interfieren con la interacción entre las quinolonas y las topoisomerasas. Desde 1998 se han descrito 5 genes *qnr* (A, B, C, D, S), normalmente localizados en plásmidos (PMQR, por *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*), en cepas de *Salmonella* spp. (Cattoir et al. 2009; Cavaco et al. 2009a, 2009b).

1.4.3. Transmisión horizontal.

Las bacterias presentan una elevada **promiscuidad** por su capacidad de intercambio genético; existiendo mecanismos para adquirir determinantes de resistencia del medio (**transformación**) o para la transmisión entre bacterias, bien directamente (**conjugación**) o bien con el concurso de un bacteriófago (**transducción**). Estos factores son fundamentales para entender la extrema rapidez con que se han dispersado los genes y las unidades subcromosómicas de resistencia, más allá de la mutagénesis y la recombinación (Salyers y Whitt, 2005).

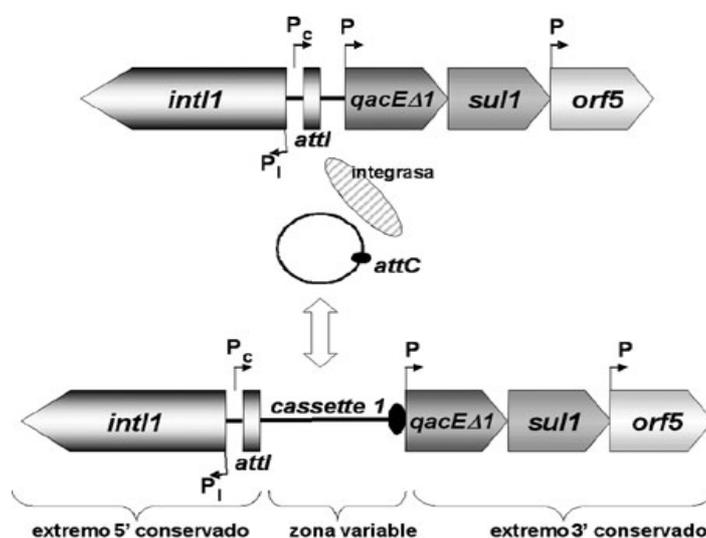


Figura 1.5. Estructura del integrón de clase 1. Tomado de Mella et al. 2004.

Además de **plásmidos** y **transposones** bacterianos, dónde se ubican con frecuencia los genes de resistencia a los antimicrobianos, los **integrones** constituyen un nuevo tipo de unidad genética que se caracteriza por la presencia de casetes conteniendo genes de resistencia (Machado et al. 2007). Los integrones no son móviles por sí mismos, pero a menudo se ubican en transposones y en plásmidos, lo que asegura su transmisión horizontal. Estos elementos se caracterizan por presentar secuencias conservadas en sus extremos, incluyendo el gen de la integrasa (*int*), una región de integración para el casete de resistencia

y promotores para los genes contenidos en el propio elemento (Rowe-Magnus y Mazel, 2002). En *Salmonella* se han descrito dos tipos de integrones, que se clasifican en función del tipo de integrasa que codifican, siendo el más frecuente el de **tipo o clase 1** (con el gen *int1*; Figura 1.5), generalmente asociado a la aparición de cepas multirresistentes (Michael et al. 2006). Según Fluit y Schmitz (1999, 2004), los microorganismos donde han sido encontrados integrones de clase 1 pertenecen mayoritariamente a géneros de bacterias Gram-negativas tales como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, y *Vibrio*.

En los integrones de clase 1 se han descrito determinantes de resistencia para los antimicrobianos beta-lactámicos, aminoglicósidos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptotricina, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina y desinfectantes como las sales cuaternarias de amonio (Fluit y Schmitz, 2004; Rowe-Magnus y Mazel, 2002). Es frecuente encontrar dos copias de este integrón dentro de un transposón conjugativo de 43 kb denominado **Isla Genética 1 de *Salmonella*** (SGI1). Este determinante de patogenicidad confiere resistencia hasta ocho antimicrobianos distintos (amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, espectinomicina, estreptomina, sulfamidas y tetraciclinas) dependiendo de la estructura de la SGI1, la cantidad de integrones de clase 1 y el tipo y número de casetes de genes de resistencia que éstos abarquen (Vo et al. 2006).

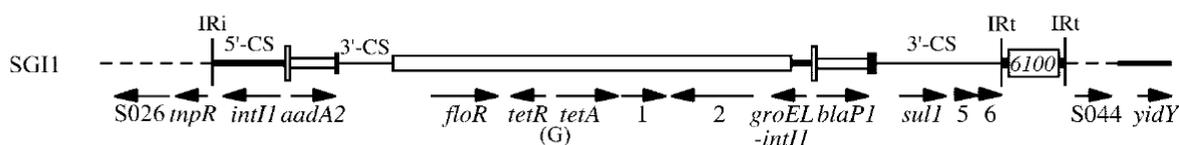


Figura 1.6. Esquema de la estructura general de SGI1 (Levings et al. 2007)

Además, estos clústers y elementos genéticos móviles facilitan la coselección de diversos determinantes de resistencia y otros genes que confieren patogenicidad y virulencia a las cepas, lo que no sólo supone una más rápida diseminación de los fenómenos de resistencia a los antimicrobianos sino un aumento del riesgo por otros factores de morbilidad (Baquero, 2008; Miriagou et al. 2006).

Tabla 1.4. Determinantes de resistencia (sin considerar las diferentes variantes alélicas) para los antimicrobianos incluidos en nuestro estudio encontrados en las diversas serovariedades no tifoideas de *Salmonella enterica* (elaboración propia a partir de Alcaine et al. 2007; Lunn et al. 2010; Michael et al. 2006 y Sölund-Karlsson et al. 2009).

Antibiorresistencia	Genes	Localización	Serovariedades
Tetraciclina	<i>tet</i>	SG1 Plásmidos	Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis Dublin, Ordonez
	<i>catA</i>	Plásmidos	Choleraesuis, Pullorum
Cloranfenicol	<i>catB</i>	Casetes en plásmidos	Enteritidis, Typhimurium
	<i>cmIA</i>	Casetes en plásmidos	Typhimurium, Choleraesuis, Agona
Cloranfenicol, florfenicol	<i>floR</i>	SG1	Typhimurium, Pullorum, Albany, Newport
	<i>strA</i>	Plásmido	Choleraesuis
Estreptomina	<i>strA + strB</i>	Cromosoma Plásmidos	Typhimurium, Enteritidis
Estreptomina, espectinomina	<i>aadA</i>	SG1 Casetes Plásmidos	Enteritidis, Typhimurium, Gallinarum Bredeney, Infantis, Choleraesuis, Hadar Derby, Tshiongwé, Agona, Newport, Kentucky, Haifa
	<i>aac(3) o aacC,</i>	Casetes, plásmidos, SG1	Typhimurium, Newport, Kentucky Enteritidis, Haifa
	<i>armA</i>	Plásmido	Enteritidis
Gentamicina, kanamicina, neomicina	<i>aacA o aac(6')</i>	Casetes, plásmidos	Typhimurium, Infantis, Saintpaul, Agona Enteritidis, Choleraesuis
	<i>aadB</i>	Casetes Plásmidos	Typhimurium, Oranienburg, Gallinarum
	<i>aphA7</i>	Plásmidos	Choleraesuis, Typhimurium
Kanamicina, neomicina	<i>dfrA</i>	Casetes SG1 cromosómica y plasmídica Plásmidos	Typhimurium, Infantis, Enteritidis, Bredeney, Albany, Emek, Wien, Agona, Choleraesuis, Gallinarum, Livingstone, Mbandaka
	<i>sul</i>	SG1 Cromosoma Plásmidos	Choleraesuis, Typhimurium, Enteritidis Agona, Infantis
Beta-lactámicos: Penicilinas	<i>bla</i> <i>PSE</i>	SG1 cromosómica	Typhimurium
	<i>bla</i> <i>CARB</i>	Plásmidos	Typhimurium
BLEE	<i>bla</i> <i>TEM</i>	Plásmidos Cromosoma	Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Saintpaul
Penicilinas y ceftazidima	<i>bla</i> <i>OXA</i>	Casetes en plásmidos	Typhimurium, Agona, Saintpaul
BLEE	<i>bla</i> <i>SHV</i>	Plásmidos	Typhimurium
Penicilinas, cefalosporinas	<i>bla</i> <i>CMY</i>	Plásmidos	Choleraesuis, Typhimurium, Wagenia, Duesseldorf, Derby, Senftenberg, Thompson
BLEE	<i>bla</i> <i>CTX-M</i>	Plásmidos	Typhimurium, Enteritidis, Panama, Infantis, Senftenberg
Penicilinas, cefalosporinas	<i>bla</i> <i>AAC</i>	Plásmidos	Bareilly, Mbandaka, Livingstone
Penicilinas, cefalosporinas	<i>bla</i> <i>DHA</i>	Plásmido	Enteritidis
Penicilinas, cefalosporinas	<i>bla</i> <i>KPC</i>		Cubana
Quinolonas	<i>gyrA</i>	Cromosoma (mutaciones en QRDR)	Typhimurium, Enteritidis
	<i>parC</i>		
	<i>gyrB</i>		
	<i>parE</i>		
Fluoroquinolonas	<i>qepA</i>		Typhimurium
	<i>qnr</i>	Plásmidos (PMQR)	Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		Typhimurium, Thompson

2. Planteamiento y objetivos

La concesión del Nobel de Química 2009 a Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steiltz y Ada Yonath por su contribución a la descripción de la estructura tridimensional del ribosoma bacteriano ha sido aprovechada por los medios de comunicación para romper una lanza a favor de la investigación en nuevos antimicrobianos que pudieran actuar sobre dicha diana. A pesar de las resoluciones de los organismos internacionales como la OMS y de las evidencias sobre la vertiginosa aparición y dispersión de antibiorresistencias que reclaman un uso responsable de los medicamentos -acompañado de la búsqueda de alternativas a estos tratamientos- aún se insiste en orientar los esfuerzos científicos hacia la síntesis o descubrimiento de nuevas moléculas.

La experiencia de estos 50 años de “era antibiótica” nos ha enseñado que el éxito de los nuevos antimicrobianos es efímero pues simplemente sirve para dar pie al siguiente paso evolutivo de los microorganismos procariontes, mucho más dotados que los eucariotes en esta desigual guerra de armamento antimicrobiano-resistencia, gracias a su extraordinaria capacidad mutagénica, recombinante y sana promiscuidad.

Igual que un repaso somero a los últimos 200 años de ciencia médica ha llevado a algunos autores a hablar de una era preantibiótica quizás deberíamos empezar a plantearnos que esta era de “tratamientos milagrosos” llega a su fin. Sin querer ser agoreros -ni mucho menos a partir de las muy limitadas conclusiones que se pueden desprender de este trabajo- pretendemos aportar nuestro granito de arena a la mejor comprensión de este fenómeno, la antibiorresistencia, que otros han calificado como “La venganza de los microbios” (Salyers y Whitt, 2005), para intentar que este periodo de fructífero uso clínico se prolongue en el tiempo.

A partir de un cepario compuesto por la mayor variedad posible de serotipos de *Salmonella enterica* aislados a partir de numerosos hospedadores trataremos de caracterizar fenotípicamente y genotípicamente la resistencia a los antimicrobianos de esta micropoblación procedente de la mitad suroccidental de la Península Ibérica.

Los **objetivos** que pretendemos alcanzar con el presente trabajo de investigación son:

1. Determinar cuáles son los serotipos, fagotipos y clones más resistentes de nuestro cepario.
2. Identificar cuáles son los antimicrobianos a los que presentan mayor resistencia las bacterias de nuestra colección.
3. Relacionar los distintos sistemas de explotación y manejo de los hospedadores de *Salmonella enterica* con sus antibiorresistencias.
4. Establecer cuáles son los principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos entre las cepas de nuestra colección, especialmente para el caso de las cefalosporinas y las quinolonas.
5. Determinar si hay alguna asociación entre las diversas antibiorresistencias y los determinantes de resistencia más habituales.

Para la consecución de los objetivos expuestos daremos los siguientes pasos:

1. Caracterizar epidemiológicamente los aislados mediante la recogida de datos y el estudio de sus relaciones clonales (PFGE).
2. Determinar la resistencia fenotípica mediante:
 - Cálculo de la concentración mínima inhibitoria frente a los antimicrobianos de uso clínico en medicina humana y animal más comunes.
 - Presencia/ausencia de enzimas beta-lactamasas en las cepas resistentes a las cefalosporinas.
 - Actividad enzimática de dichas proteínas.
3. Identificar la presencia de integrones de tipos 1 y 2 así como de sus casetes génicos asociados, mediante PCR, RFLP y secuenciación.
4. Determinar la existencia de los determinantes de resistencia más frecuentes a las cefalosporinas y las quinolonas mediante PCR y secuenciación.
5. Hacer un tratamiento estadístico adecuado de los datos para intentar aproximarnos lo más fielmente posible a la realidad.

3. Material y métodos.

3.1. Material biológico.

Se dispuso para este estudio de 203 cepas aisladas por las unidades de enfermedades infecciosas de las Facultades de Veterinaria de Madrid (Vigilancia Sanitaria Veterinaria, VISAVET-UCM), Córdoba (UCO) y Cáceres (UEX) entre 1997 y 2008 (Figuras 3.1 y 3.2). Las salmonelas fueron aisladas a partir de muestras biológicas obtenidas de animales de las Comunidades Autónomas de Extremadura y Andalucía, tanto enfermos (18%) como aparentemente sanos (82%); de muestras control de matadero (ganglios mesentéricos y/o heces frescas en cerdos y de pollos), de casos clínicos (heces, hisopos cloacales e improntas de vísceras), polvo y heces de naves avícolas o huevos (tabla en anexos).

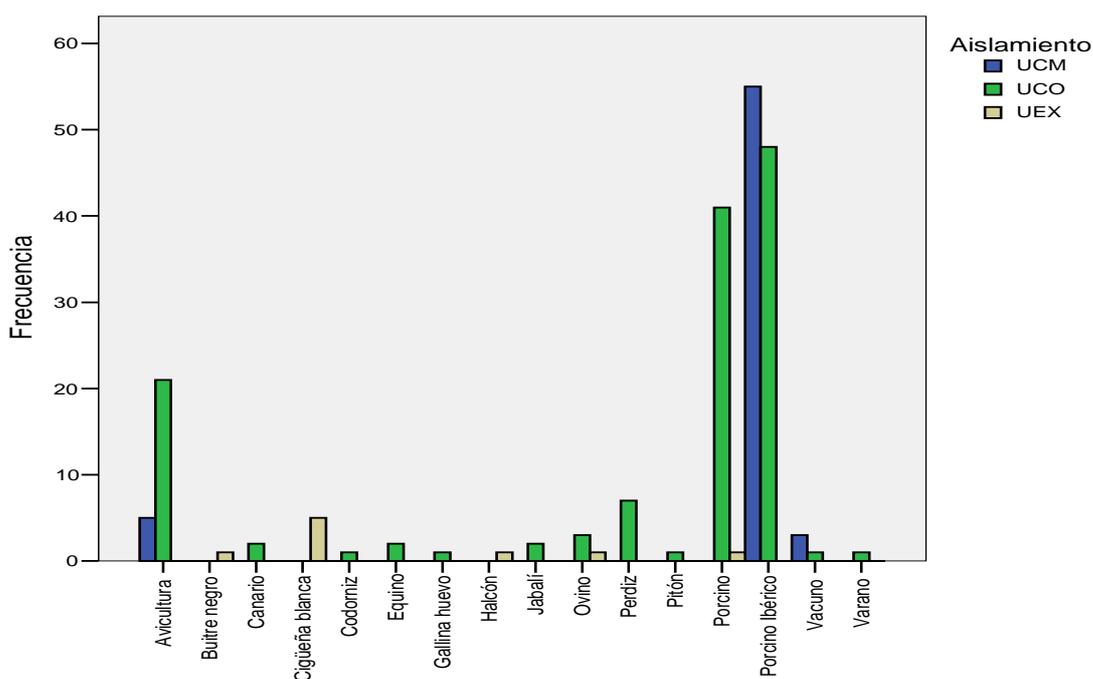


Figura 3.1. Distribución de las cepas por especies hospedadoras y Facultad de Veterinaria de origen: Cáceres (UEX), Córdoba (UCO) y Madrid (UCM).

Las especies hospedadoras por orden de importancia fueron: cerdo, pollo, gallinas de puesta, vacuno, perdiz, ovino, equino, canario, jabalí, pitón y varano. Las cepas nos fueron entregadas serotipadas y fagotipadas cuando procedía (serotipos Typhimurium, 4,5,12:i:-,

Enteritidis, Hadar y Virchow), por los laboratorios de origen o bien por el Laboratorio Nacional de Referencia Salmonella-Shigella (ISCIII, Majadahonda, Madrid) o el Centro de Investigación en Sanidad Animal (INIA, Algete, Madrid).

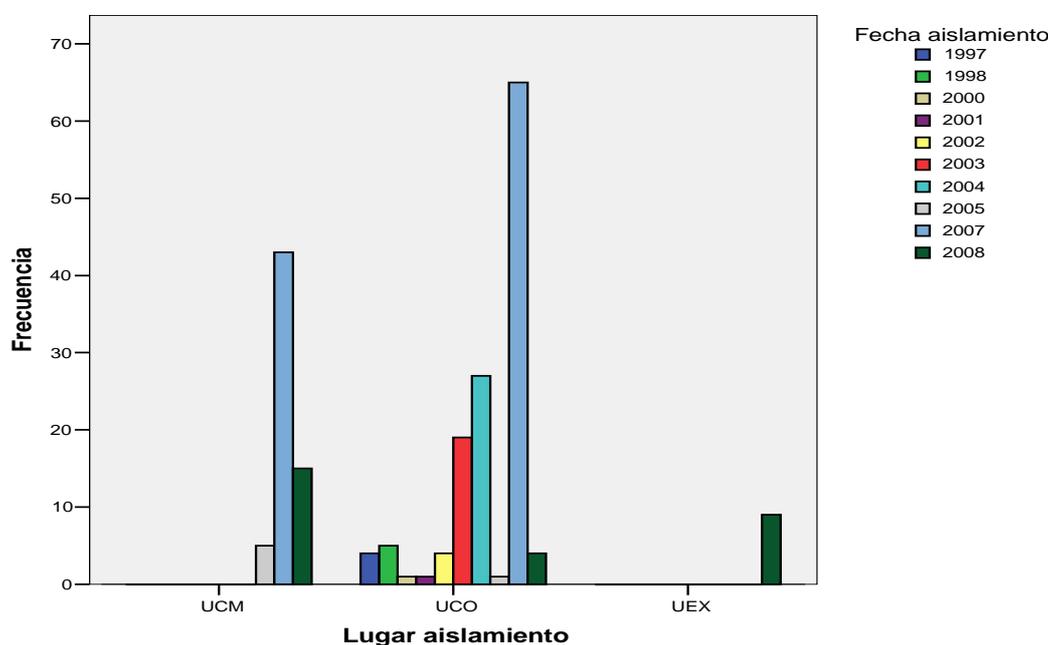


Figura 3.2. Número de cepas aisladas entre 1997 y 2008 por cada Facultad de Veterinaria de origen: Cáceres (UEX), Córdoba (UCO) y Madrid (UCM).

3.1.1 Transporte, cultivo y conservación de las cepas

Se ha usado como medio de cultivo de referencia la Tryptona Soya Agar (TSA, Oxoid®) tanto en placa, para recuperar o refrescar, como en tubo Eppendorf de 1,5 ml para el transporte. Cuando se recibían las cepas desde los laboratorios colaboradores (Madrid, Córdoba y Cáceres), se hacía un pase por agotamiento del tubo sembrado por punción a una placa de Salmonella-Shigella (Conda®) para cerciorarnos del cultivo puro. Tras incubar 18-24 horas a 37° C en aerobiosis se toman 3-4 colonias oscuras (las claras hubieran sido Shigella) y se hace una siembra por agotamiento en TSA. Para mayor seguridad en la conservación del cepario se mantuvieron dos colecciones completas, cada una con método distinto de conservación, en dos ultracongeladores (-70° C) de diferentes edificios.

a. Conservación en criovial.

Con un hisopo estéril se toman la mayor parte de las colonias crecidas en TSA según hemos explicado en el punto anterior. Se sumerge el hisopo entre las bolas microperforadas suspendidas en el medio de cultivo del criovial (Vikakstore®) hasta que se desprende el inóculo. Se deja reposar dos minutos y extraemos el medio con micropipeta para después congelar a -70°C .

b. Conservación en glicerol.

Las células resisten la ultracongelación suspendidas en una dilución de glicerol al 20%. Pipeteamos 300 μl de la suspensión de las salmonelas en LB (ver preparación del inóculo en 3.2.b.) en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se resuspende con 200 μl de glicerol estéril diluido al 50% en agua destilada, que se conserva a -70°C .

3.2. Estudio de las relaciones clonales.

Pese a componerse la colección de aislados sin relación epidemiológica aparente decidimos realizar un estudio de relaciones clonales. Escogimos el PFGE por ser la técnica más habitual en *Salmonella* y estar estandarizada por PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet>). Esta red de laboratorios, aunque dependiente del *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) estadounidense, es referencia mundial para la salmonelosis y otras toxiinfecciones alimentarias. Esta parte del planteamiento experimental fue realizada en colaboración con el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) dependiente de la Universidad Complutense de Madrid, donde realicé varias estancias de investigación.

3.2.1. Electroforesis de campo pulsado (PFGE).

El PFGE es una técnica que combina endonucleasas de restricción y electroforesis para establecer un patrón de bandas propio de cada muestra de ADN. De manera que comparando los distintos patrones, gracias a los correspondientes estudios estadísticos, se puede establecer la relación genética entre las cepas problema. Utilizamos el equipo Chef-DR®III System de BioRad así como los reactivos de dicha marca mientras no se indique lo

contrario.

El ensayo se divide en tres fases:

- Extracción y purificación del ADN
- Digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *Xba* I
- Electroforesis del producto de digestión en condiciones de cambio de la dirección del campo eléctrico.

3.2.1.1 Extracción y purificación del ADN: preparación de los bloques.

1. El molde es sellado por uno de los extremos con cinta de autoclave (10 bloques por molde), preparándose dos bloques para cada cepa.

2. Se prepara una suspensión bacteriana diluída al 20% en el colorímetro. Con una pipeta Pasteur rellenamos la cubeta con 2 ml de TE y con un hisopo tomamos las colonias de una placa de TSA.

3. Prelisis celular en tupo Eppendorf

-200 µl de la suspensión bacteriana

-10 µl de proteinasa K (4 µg/µl, Roche®)

-200 µl de agarosa (atemperada a 50°C, Pronadisa®)

La mezcla homegenizada se introduce en cada molde.

4. Lisis bacteriana:

En un tubo universal añadimos:

-5 ml de Buffer de lisis

-25 µl de proteinasa K

-Bloques del paso anterior solidificados en el molde

5. Se incuba 2 horas a 54°C en agitación junto al Buffer TE 1y agua ultrapura estéril que utilizaremos en los lavados.

3.2.1.2 Lavados

1. Se vacían los tubos universales en un filtro, con mucho cuidado de no perder los bloques.

2. Se añade 10 ml de agua ultrapura estéril (precalentada) e incubamos 10 minutos a 50°C en agitación.

3. Se vuelven a vaciar los universales en el filtro y volvemos a añadir otros 10 ml de

agua. Incubamos de nuevo 10 minutos a 50°C en agitación.

4. Se desecha el agua y repetimos el proceso anterior 4 veces más pero añadiendo 10 ml de Buffer TE 1X (precalentado a 50° C) e incubando en las mismas condiciones.
5. Se incorpora cada bloque a en un tubo Eppendorf con 1 ml de Buffer TE.
6. Se conserva en refrigeración a 4° C.

3.2.1.3 Predigestión

1. Se prepara un eppendorf con 180 µl de agua Milli Q estéril y 20 µl de Buffer Tango.
2. Se sumerge un tercio de cada bloque en tubo Eppendorf con Buffer Tango diluido 1:10.
3. Se incuba 10 minutos a 37 °C en el baño sin agitación.

3.2.1.4 Digestión

1. Pipeteamos el buffer anterior y añadimos:
 - 175 µl de agua ultrapura estéril
 - 20 µl de Buffer Tango
 - 5 µl de enzima *Xba* I (5 U, Roche®)
2. Se incuba durante 2 h a 37° C en el baño sin agitación.
3. El contenido se desecha de nuevo y se añaden 200 µl de TBE 0,5X.

3.2.1.5 Electroforesis

1. Tanto para la cubeta de electroforesis como para la elaboración de los geles se necesita tampón TBE 0,5X.
2. Hay que atemperar la cubeta a 14°C.
3. El soporte para el gel se prepara limpiándolo bien con alcohol.
4. Se seca el bloque previamente a su colocación en el peine.
5. Los bloques son colocados en el peine con las cepas control *Salmonella Bradenburg* H9812 (PulseNet) en los extremos y el centro.
6. Se coloca el peine y echa la agarosa (al 1%, de Pronadisa) quedándonos siempre con un poco en la botella y previamente a tapar. Cuando el gel esté seco se quita el peine y se rellenan los pocillos con la agarosa que ha sobrado, se deja secar y se quita

el soporte lateral del gel.

7. Se limpia bien tanto los laterales como la parte de abajo del gel de los restos de agarosa.

8. Poner el soporte en la cubeta y encajar el gel en él.

9. Se deja correr 20 h a 14 °C, ángulo de 120° y 6 V.

10. El gel es teñido transcurrido dicho tiempo con SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen).

3.2.1.6. Captura de imagen y tratamiento de datos.

La captura de la imagen del gel se realizó en un equipo Fluor-S Multimager y software Quantity One 4.4.0. (ambos de BioRad®). Se aplicó un coeficiente Dice del 1% para construir los dendogramas (similitud de los patrones de bandas) con Bionumerics 5.2 (Applied Maths-BioRad®). La asignación de bandas se hizo de manera manual. Se consideraron del mismo pulstotipo a todas las cepas con idéntico patrón de bandas.

Estudio fenotípico

3.3. Sensibilidad antimicrobiana: la concentración mínima inhibitoria.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es “la menor concentración de un agente antimicrobiano (en mg/l) que, bajo condiciones *in vitro* definidas, impide el crecimiento visible de un microorganismo en un período de tiempo concreto” (EUCAST, 2003).

Se trata del método aceptado y estandarizado por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) de la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) y usado en numerosos países punteros en la investigación microbiológica como Francia, Alemania, Suecia, Reino Unido y los Estados Unidos (Kahlmeter et al. 2006).

3.3.1 El método de la microdilución en medio de cultivo.

Este método ha sido descrito en la norma ISO 20776-1:2006 como referencia para el “ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de susceptibilidad antimicrobiana”. Según dicha norma la microdilución en medio es la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos consistente en hacer disoluciones crecientes (normalmente en progresión geométrica de razón 2) del agente antimicrobiano en placas de microdilución con capacidad de $\leq 200 \mu\text{l}$ e incorporando volúmenes apropiados de otro medio de cultivo con un inóculo de la bacteria problema.

a. Los reactivos

El **medio de cultivo** utilizado fue Mueller-Hinton (Oxoid®) elaborado según las condiciones especificadas en la propia norma ISO. En todos los casos se conocían el número de lote, la potencia, la fecha de caducidad y las condiciones particulares de almacenamiento de cada uno de los estándares de los **agentes antimicrobianos** suministrados por las empresas farmacéuticas. La cantidad de antimicrobiano necesaria para elaborar la **disolución madre**, a partir de la cual se harán las diluciones seriadas para el ensayo, se calcula a partir de la fórmula: $m=V \cdot \rho / P$ Donde **m** es la masa del agente expresada en gramos (g), **ρ** es la concentración de la primera solución (mg/l), **P** es la potencia del agente antimicrobiano (mg/g) y **V** es el volumen del diluyente (l).

La concentración en la primera solución fue 10.240 mg/l usando los disolventes especificados por el fabricante del antimicrobiano, o bien la farmacopea europea. Posteriormente se obtuvieron las 4 diluciones madre con los siguientes diluyentes recomendados por la citada norma ISO (Tabla 2.1) a partir de las cuales mediante dilución a su vez en volúmenes ascendentes del medio de cultivo Müller-Hilton se obtuvieron las soluciones de trabajo desde concentraciones 0,25 a 1.024 mg/l en progresión geométrica 2, excepto para las cefalosporinas y fluroquinolonas en las que el rango de concentraciones fue de 0,06 a 512.

Posteriormente 50 μl de cada disolución final es dispensada en las placas de microdilución (microtiter fondo V estéril Deltalab®) de menor a mayor concentración. Se

obtiene una concentración doble de la deseada pues incorporaremos posteriormente otros 50 µl del inóculo en el mismo medio de cultivo, obteniendo así concentraciones de CMI de entre 0,13 y 512 mg/l (o bien 0,03-256 mg/l, como ya explicamos anteriormente para cefalosporinas y quinolonas). En todo caso incluimos un pocillo control positivo y otro negativo según lleve o no inóculo, sin agente antimicrobiano disuelto en el medio. Según la norma ISO las placas se pueden almacenar, debidamente precintadas, en congelación (-20 °C) hasta 3 meses. Debido a que compuestos como el ácido clavulánico se degradan más fácilmente decidimos conservarlas todas a -70 °C.

Tabla 3.1. Disolventes y diluyentes necesarios para la preparación de las microdiluciones.

Antimicrobiano	Disolvente	Diluyente
Estreptomicina	Agua destilada	Agua destilada
Neomicina	Agua destilada	Agua destilada
Kanamicina	Agua destilada	Agua destilada
Gentamicina	Agua destilada	Agua destilada
Apramicina	Agua destilada	Agua destilada
Cloranfenicol	Etanol 95% volumen	Agua destilada
Florfenicol	Etanol 95% volumen	Agua destilada
Ampicilina	Tampón fosfato 0,1 M. pH 8,0	Tampón fosfato 0,1 M. pH 6,0
Amoxicilina	Tampón fosfato 0,1 M. pH 6,0	Tampón fosfato 0,1 M. pH 6,0
Amoxicilina+Ác. clavulánico (2:1)	Tampón fosfato 0,1 M. pH 6,0	Tampón fosfato 0,1 M. pH 6,0
Cefalotina	Tampón fosfato 0,1 M. pH 6,0	Agua destilada
Cefiofur	Tampón fosfato 0,1 M. pH 6,0	Agua destilada
Cefotaxima	Agua destilada	Agua destilada
Ceftazidima	Solución saturada de bicarbonato sódico	Agua destilada
Cefquinoma	Tampón fosfato 0,1 M. pH 8,0	Agua destilada
Ácido nalidíxico	Mitad del volumen de agua, 1 vol. De NaOH 1 M para disolver, por último se lleva al volumen total con agua destilada.	Agua destilada
Enrofloxacin	Mitad del volumen de agua, 1 vol. De NaOH 1 M para disolver, por último se lleva al volumen total con agua destilada.	Agua destilada
Ciprofloxacina	Mitad del volumen de agua, 1 vol. De HCl 1 M para disolver, por último se lleva al volumen total con agua destilada.	Agua destilada
Sulfametoxazol	Mitad del volumen de agua, 1 vol. H ₂ SO ₄ 0,05M para disolver (a 80° C), por último se lleva al volumen total con agua destilada	Agua destilada
Trimetoprim-sulfametoxazol (1:19)	Mitad del volumen de agua, 1 vol. De HCl 0,1 M para disolver, por último se lleva al volumen total con agua destilada.	Agua destilada
Trimetoprim	Mitad del volumen de agua, 1 vol. De HCl 0,1 M para disolver, por último se lleva al volumen total con agua destilada.	Agua destilada
Tetraciclina	Agua destilada	Agua destilada
Espectinomicina	Agua destilada	Agua destilada

b. El inóculo y la incubación.

Con el objetivo de lograr una suspensión celular final en el pocillo de $5 \cdot 10^5 \pm 3 \cdot 10^5$ UFC/ml, sembramos en Tryptona Soya Agar (TSA, Oxoid®) a partir del criovial de conservación y a la mañana siguiente tomamos de tres a cinco colonias que transferimos a 5 ml de medio MH e incubamos 2,5 horas en agitación (250 rpm). Ajustamos la suspensión bacteriana con solución salina estéril hasta lograr un patrón de turbidez de entre 0,08 y 0,13 a longitud de onda 625 nm en 1 cm de recorrido de cubeta (Perkin Elmer®), equivalente al patrón 0,5 de la escala McFarland, obteniendo una concentración celular de $1 \cdot 10^8$ UFC/ml. Posteriormente se diluyen 120 μ l de la suspensión bacteriana en 11,880 ml de caldo MH, siendo ya el inóculo que se sembrará (50 μ l) en las placas de microtitulación.

Puntualmente se debe hacer un **control de calidad** de las suspensiones normalizadas de inóculo para cerciorarse de que la concentración real de las mismas es de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml. Se toman 10 μ l del pocillo de control positivo (sin antimicrobiano) justo después de la inoculación para diluirlo en 10 ml de solución salina. De esta suspensión se siembran 100 μ l sobre una placa de TSA. Se deberían obtener de 20 a 80 colonias tras 18-20 horas de incubación a 37 °C en aerobiosis.

Las placas de microdilución se incubaron selladas con parafilm hermético (nunca se apilarán más de 5 para asegurarnos una calefacción homogénea) a 37 °C durante 18 (\pm 2) horas.

c. Lectura de los resultados.

Cuando el control positivo tiene un botón de crecimiento o una turbidez definida y no hay crecimiento en el control negativo se procede a leer los resultados. La CMI es la concentración más baja de antimicrobiano en cuyo pocillo no hay crecimiento bacteriano visible. En cuanto a la CMI para los compuestos con sulfametoxazol y trimetoprim se considera la concentración más baja que inhibe aproximadamente el 80% del crecimiento comparado con el control positivo.

d. Control de calidad.

En cada par de las placas de microtitulación que sirven para realizar el ensayo en 10

cepas problema se incluyen dos cepas de colección como control de calidad *Staphylococcus aureus* ATCC 29.213 y *Escherichia coli* ATCC 25.922. Para considerar válido el experimento, el valor de CMI para cada una de ellas debe estar dentro de los intervalos dados por la norma ISO 20.776-1:2006, excepto en los siguientes antimicrobianos: estreptomina, neomicina, apramicina, florfenicol, cefalotina, ceftiofur, cefquinoma y enrofloxacina, para los que tomamos como referencia los valores aportados por EUCAST para estas dos cepas (<http://www.eucast.org/>).

e. Resistencia.

Hemos seguido las recomendaciones de EUCAST para determinar la resistencia epidemiológica de nuestro cepario. Estadísticamente se determina el punto de corte (cut off value) de la CMI a partir de los resultados de las cepas salvajes (WT, del inglés *Wild Type*) de los diversos microorganismos. Estos valores son fruto de la colaboración desinteresada de multitud de laboratorios de toda Europa (EUCAST, 2000b). En algunos casos aún no se han publicado los valores oficiales por no tratarse de cifras estadísticamente significativas (indicado con un * en la siguiente relación). A continuación indicamos entre paréntesis el máximo valor de CMI (mg/l) de cada antimicrobiano para que una cepa sera considerada WT, por encima de dicho valor se considera resistencia epidemiológica:

Estreptomina* (32),	Espectinomicina* (256),	para <i>Escherichia coli</i> por no existir datos para
Neomicina (4),	Kanamicina* (4),	<i>Salmonella</i> spp.),
Apramicina* (8),	Gentamicina (2),	Ácido nalidixico (16),
Cloranfenicol (16),	Florfenicol (16),	Enrofloxacina (0,13),
Ampicilina (4),	Amoxicilina (4),	Ciprofloxacina (0,064),
Amoxi+Ác.	Sulfametoxazol (256),	Trimeto+sulfametoxazol (1),
Clavulánico (4),	Cefalotina* (32),	Trimetoprim (2),
Ceftiofur (2),	Tetraciclina (8)	
Cefotaxima (0,5),	Ceftazidima (2),	Cefquinoma (0,25)

Calculamos, asimismo, las **concentraciones mínimas inhibitorias** 50, 75 y 90 (CMI50, CMI75 y CMI90) que se definen como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento del 50, 75 y 90%, respectivamente, de los microorganismos (Píriz, 1989). El rango o intervalo nos indica los valores de CMI máximo y mínimo que inhiben el crecimiento de las salmonelas encuadradas en un determinado serovar: por un lado de las ocho serovariedades en las que disponíamos de más de cinco cepas: Typhimurium, 4,5,12:i:-, Anatum, Choleraesuis, Enteritidis, Derby, Mikawasima y Tomegbe. Y de manera diferencial para las cepas de tres serovares aisladas de cerdo blanco: Brandenburg, Rissen y Typhimurium. El resto de cepas, de serotipos con cinco o menos aislados, se agruparon bajo el epígrafe

“otras”. Por último, se calcula el porcentaje de cepas que presentan resistencia a cada antimicrobiano, o sea, las que se inhiben a CMI mayor que la establecida para las cepas salvajes (EUCAST, 2000a). Todos estos resultados están contenidos en los anexos.

3.4. Actividad beta-lactamasa

Una vez caracterizada la resistencia a los antimicrobianos del panel nos centramos en los mecanismos que posibilitan dicho fenómeno, especialmente en lo referido a quinolonas y cefalosporinas. Como hemos visto en la introducción, uno de los principales mecanismos de resistencia a los beta-lactámicos es la producción por parte de las bacterias de enzimas que hidrolizan el anillo beta-lactámico de dichos antimicrobianos: las beta-lactamasas. Nos hemos basado en esta parte experimental en la experiencia adquirida en nuestros laboratorios gracias sobre todo a los trabajos previos de las ya doctoras María Lorenzo (2009) y Nuria García (2010).

3.4.1 Prueba cualitativa en placa.

Este análisis se realiza previamente a la cuantificación de la actividad beta-lactamasa para comprobar que la resistencia a las cefalosporinas se debe a dichas enzimas y no a otros mecanismos. Se vierte una gota de la cefalosporina cromogénica nitrocefín (500 µg/ml, Calbiochem®) sobre cada colonia problema -es decir de cepas resistentes a las cefalosporinas- tras su crecimiento a 37 ° C durante 18 horas (+/- 2). En caso de que presente actividad β-lactamasa el nitrocefín virará del marrón-amarillo original a tonos rojo-anaranjados en el siguiente minuto. En función de la intensidad de la reacción ésta será valorada como negativa, baja (tonos cálidos claros) o alta (rojizo).

3.4.2 Cuantificación.

Las cepas positivas a la prueba cualitativa eran sometidas, tras la preparación de su extracto acelular, al test espectrofotométrico de actividad betalactámica, con el nitrocefín como sustrato y el ácido clavulánico como perfil de inhibición.

3.4.2.1 Preparación de extractos acelulares.

3.4.2.1.1 Precultivo.

Recuperamos las cepas conservadas en criopreservación en un medio de cultivo sólido específico (Salmonella-Shigella, CONDA®) con el objetivo de cerciorarnos del cultivo puro. Se incuba toda la noche a 37° C en aerobiosis. A continuación se sembraban 4-5 colonias de las placas de agar en 5 ml de medio líquido (LB Broth, CONDA®). Se incuba durante la noche a 37° C en aerobiosis y agitación (175 rpm).

3.4.2.1.2 Cultivo.

Posteriormente se hace una nueva siembra por dilución 1:100 de la anterior, en el mismo medio. Es decir 0,4 ml de suspensión bacteriana en 40 ml de LB en matraz de Erlenmeyer. Se incuba en incubador orbital (agitación 4.000 rpm). Hay que controlar el crecimiento celular para evitar que las bacterias entren en fase estacionaria, aunque permitiendo un crecimiento suficiente. Medimos la densidad óptica (DO) a 600 nm de longitud de onda de tres cultivos a partir de una hora de crecimiento con intervalos de 15 minutos hasta llegar a valores de 0,4-0,8 de absorbancia. Una vez logrado ésto se meten en hielo todas las cepas para detener el crecimiento y se pasa a medir la DO de todas las cepas. Algunas requerirán continuar con el crecimiento en el agitador orbital o dilución en medio LB estéril. Guardamos 150 µl del cultivo por si fuera necesario repetir la prueba cualitativa de determinación de la producción de actividad β-lactamasa en las células vivas con nitrocefin.

3.4.2.1.3 Lisis celular.

Se centrifuga cada cultivo a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4° C, en tubos Falcon estériles de 50 ml. Resuspendemos el sedimento o *pellet* en 50 ml de tampón fosfato sódico (PiNa) 50 mM, pH 7. Lavamos y volvemos a centrifugar en idénticas condiciones para eliminar los restos del medio de cultivo. Se resuspende de nuevo en 2 ml de PiNa 50 mM, pH 7. En este punto podemos seguir con el protocolo, y por tanto sonicar, o bien congelar a -80° C.

Para lisar las células recurrimos a un método por ultrasonidos (Vibra Cell®). Los cultivos, 20 veces concentrados en PiNa, se mantienen suspendidos en agua-hielo antes y durante la sonicación con microsonda a 100% de potencia y con un 33% de eficiencia en

ciclos de 30 segundos. Se aplican los ciclos durante 60-120 segundos hasta que la suspensión bacteriana pierde turbidez. Tras centrifugar a 8.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, con el objetivo de eliminar restos celulares indeseados, el sobrenadante, compuesto por citosol y membrana plasmática, se recoge en al menos dos alícuotas en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Los extractos acelulares se almacenaban a -80° C hasta su utilización.

3.4.2.2 Prueba cualitativa en tubo.

A partir de los extractos conservados vamos a volver a contrastar de manera cualitativa la actividad beta-lactamasa con el propósito de ajustar la cantidad del mismo que será necesario para la parte cuantitativa del ensayo. Se toman 20 µl de cada extracto y se enfrentan a 20 µl de nitrocefín (50 µg/ml en PiNa 0,1M pH 7) en un tubo a temperatura ambiente durante un par de minutos. El cambio de coloración en los extractos –desde el amarillo al rojo pasando por un intermedio rosáceo- fue evaluado mediante signos positivo/negativo. La aparición de color rojo en el tubo, después de 2 minutos, se consideró positivo +++ (alta actividad), los tonos rosáceos indican actividad media (++) o baja (+). Por último, el amarillo equivalente al control negativo se consideró negativo (-).

3.4.2.3 Determinación cuantitativa de la actividad beta-lactamasa.

En función de la concentración de beta-lactamasas en el extracto acelular, la degradación del nitrocefín será más o menos intensa. Al tratarse de una cefalosporina cromogénica su degradación supondrá un cambio de color detectable a una longitud de onda de 486 nm. El ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro con carrusel atemperado (Espectrofotómetro Helios-beta, Thermospectronic®) de manera que se pudieron hacer cuatro medidas consecutivas a una temperatura constante de 37° C en cada una de las cubetas problema: dos con el nitrocefín como sustrato y otras dos añadiendo el clavulanato como inhibidor. Se descartó realizar el ensayo con EDTA puesto que entre las cefalosporinas detectadas genótipicamente y mediante isoelectroenfoque (enzimas TEM y OXA), ninguna es inhibida por dicho compuesto (Bush et al. 1995b). El ensayo se repitió desde el precultivo de manera que contamos con cuatro medidas de cada cepa con y sin clavulanato.

Para realizar esta prueba son necesarios los siguientes reactivos: nitrocefín (Calbiochem®, 500 µg/ml), tampón fosfato sódico (PiNa 0,1M pH 7.0 atemperado a 37° C) y

clavulanato sódico (Sigma®, 1 mg/ml).

3.4.2.3.1 Procedimiento.

Descongelamos los extractos tan sólo una vez por ensayo y se mantienen en agua-hielo hasta su utilización. Las dos primeras cubetas contienen 860 µl (para los extractos + en el ensayo cualitativo), 870 µl (++) o 880 µl (+++) del tampón PiNa atemperado a 37° C; más 100 µl del nitrocefin. A las dos últimas cubetas se incorporan, además, 10 µl del clavulanato así como se resta esos mismos 10 µl a la cantidad de tampón de cada cubeta. La cantidad de extracto convenida en función de la actividad cualitativa demostrada (10 µl en casos de alta actividad ó +++, 20 µl en ++ y 10 µl en poco activos: +) se deposita en la cubeta. Rápidamente se voltea cinco veces cada cubeta usando parafilm como sellador y acto seguido se depositan en el carrusel para proceder a la medición de la actividad enzimática (absorbancia, ABS) frente al tiempo (minutos), con hasta seis mediciones cada 30 segundos, que generará la correspondiente curva cinética. El valor de la pendiente ($\eta = \Delta \text{ABS} / \Delta t$) se calculó siempre en el tramo de la curva en fase exponencial, es decir antes de que comenzara el agotamiento enzimático del sustrato, procurando que los valores estuvieran comprendidos entre 0,01 y 0,1. La actividad enzimática se calcula según la ley de Beer-Lambert a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Act. Enz. (mU/mg)} = [(\eta * 10^6 / 20500) / V_{\text{extracto}}(\text{ml})] / C_{\text{PT}}(\text{mg/ml})$$

Donde Act. Enz es la actividad enzimática medida en mU/mg. η es la pendiente de la absorbancia (ABS) frente al tiempo (minutos). Aplicando la Ley de Beer-Lambert se calcula la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo (U/ml), y de aquí la actividad enzimática en U/ml de extracto (siendo U las micromol·min⁻¹). Se aplica un factor de corrección de 10⁶ mientras que 20.500 (M⁻¹ cm⁻¹) es el coeficiente de extinción de Beer-Lambert para una longitud de onda de 486 nm. V_{extracto} volumen (ml) del extracto sobre el que se ha cuantificado la actividad y C_{PT} la concentración de proteínas totales del extracto (mg/ml) según el método de Bradford (ver 3.4.2.3.2). Por último se calcula la actividad específica (U/mg proteína).

Finalmente obtuvimos dos medidas de la actividad enzimática que se corresponden

con los dos ensayos completos que hemos realizado. En cada tanda elegimos la mayor pendiente (de las dos posibles) de actividad cinética y la menor concentración de proteínas totales de cada extracto, o sea que obtenemos la actividad enzimática de mayor dispersión posible, representándose gráficamente la media de ambas actividades junto a su barra de error.

3.4.2.3.2 Cálculo de la concentración de proteínas totales (Método de Bradford).

El método de Bradford (1976) se basa en una reacción colorimétrica del reactivo del mismo nombre en función de la concentración de proteínas en el extracto problema (que virará de marrón a tonos azules más intensos cuanto más proteína contenga). Al medir la absorbancia para una longitud de onda de 595 nm y aplicar la función de la recta patrón de medidas sucesivas (2, 5, 10, 15 y 20 μ l) sobre un estándar de proteína sérica bovina de concentración inicial conocida (140mg/ml) averiguamos la concentración de proteína total (mg/ml).

Se necesitan 200 μ l de reactivo de Bradford (5x), 700 μ l de agua destilada y 100 μ l de extracto diluido 1:10 por reacción. Se ordenan las diversas reacciones de menor a mayor intensidad y se procede a la medición en el espectrofotómetro. Se realizaron dos ensayos por extracto, de modo que obtuvimos dos medidas de la concentración de proteínas totales por cepa.

3.5 Determinación de enzimas beta-lactamasas mediante isoelectroenfoque.

Esta técnica permite comprobar si la actividad enzimática medida en el punto anterior se debe a una o a varias enzimas. Se trata de un tipo de electroforesis en el que las moléculas anfotéricas, como las proteínas, se separan debido a la diferencia de potencial en un gel con un gradiente de pH. Las moléculas se agrupan según su punto isoeléctrico (pI) dentro de dicho rango de pH entre el más alcalino (en cátodo) hasta el más ácido (en ánodo). De este modo pudimos comprobar si realmente únicamente había una proteína beta-lactamasa por muestra así como el tipo que se trataba en función de su punto isoeléctrico (por ejemplo el pI de TEM es 5,7 y el de OXA 7,7).

Para llevar a cabo esta prueba utilizamos los siguientes reactivos de Bio-Rad: Buffer de ánodo (10x), buffer de cátodo (10x), IEF standard (250 µl), geles IEF (pH3-pH10) con capacidad de cada uno de los 10 pocillos para 30 µl de extracto crudo de proteína.

Se procura utilizar el volumen necesario de extracto problema para que la cantidad de proteína fuera en cada caso igual o superior a 30 µg. Para ello nos basamos en los resultados obtenidos por el método de Bradford, tal como explicamos en el punto 3.4.2.3.2. Completamos cada muestra hasta 20 µl con agua destilada y 2 µl de glicerol (al 50%) como tampón de carga. Se utiliza una cubeta de electroforesis vertical (BioRad) con una intensidad de corriente constante de 13mA.

Para el revelado se usa de nuevo la cefalosporina cromogénica nitrocefín (0,1mM), que hace las veces de sustrato para las beta-lactamasas problema, tras diluirlo en tampón PiNa (0,1 N, pH 7.0) y atemperarlo a 37° C durante 15 minutos.

Estudio genotípico

Tras estudiar la resistencia fenotípica a los distintos antimicrobianos del panel y profundizar en mecanismos concretos como las enzimas beta-lactamasas, en lo que a resistencia a las cefalosporinas se refiere, pasamos a buscar y caracterizar los determinantes genéticos de resistencia.

3.6 Extracción y cuantificación del ADN

3.6.1. Extracción

Adaptamos el método de extracción de ADN basado en el fenol-cloroformo descrito por Cheng y Jiang (2006):

1. Preparación del inóculo.

En 5 ml de medio LB se siembran 3-4 colonias provenientes de una placa de TSA con las salmonellas en cultivo puro, a continuación se cultivaron a 37°C en aerobiosis durante 18-

24h en agitación (200 rpm). Nos aseguramos que no han entrado en fase estacionaria midiendo la absorbancia ($\lambda=625$) de la suspensión celular en el espectrofotómetro: $1,5 > \text{ABS} < 2$. Se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 min. a 4° C y se desecha el sobrenadante.

2. Lavados con STE

Se resuspende el pellet dos veces seguidas con 400 μl de tampón STE (NaCl 100 mM, Tris HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8). Se centrifuga para poder retirar el sobrenadante a 10.000 rpm durante 1 min. a 4°C.

3. Resuspender en TE

Sobre el pellet anterior aplicamos 400 μl del tampón TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8) y se agita en un vortex.

4. Lavado con fenol tris-saturado

Se adicionan 400 μl de una mezcla de Tris (2mM pH 8) y fenol. Agitamos suavemente durante unos segundos. Luego se centrifuga a 10.000 rpm durante 2 min. a 4° C y tomamos con una micropipeta 380 μl de la fase acuosa en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml.

5. Mezcla con fenolcloroformo.

Se añaden en el eppendorf 380 μl de fenolcloroformo (1:1) y mezclamos bien. Se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto a 4° C. Transferimos 360 μl de la fase acuosa superior a otro eppendorf.

6. Cloroformo saturado.

Adicionamos 360 μl de cloroformo saturado con agua (1:1). Se mezcla bien y retiramos 350 μl de la fase acuosa. Mezclamos ésta con 5 μl de ARNasa (10mg/ μl) e incubamos a 37°C durante 10 min.

7. Cloroformo saturado.

Se realiza un nuevo lavado con 350 μl de cloroformo saturado. Transferimos 340 μl de la fase acuosa superior a un eppendorf de 1,5 ml.

8. Conservación del ADN

Todos los viales se conservaron en congelación a -20° C

3.6.2 Cuantificación del ADN

Para asegurarnos de que el método de extracción había funcionado correctamente cuantificamos el ADN mediante la comparación con el patrón del fago λ .

Como conocemos la concentración del [fago λ]=50ng/ μ l, podemos relacionar la cantidad en cada carrera del gel de electroforesis con el tamaño de las muestras de ADN. Es decir, al comparar las bandas del ADN problema con las bandas similares del fago podemos inferir la cantidad aproximada de ADN problema de cada banda y por extensión su concentración.

Electroforesis.

Preparamos un gel de agarosa (Agarose D1 Low EEO, Conda®) al 0,7% en TBE (x0,5, BIO-RAD®) con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio (10mg/ml, BIO-RAD®) donde correremos las muestras de ADN (9 μ l + 1 μ l de TC) en cubeta de electroforesis (BIO-RAD®) junto a las tres preparaciones de fago antes especificadas a 50-80 V. Las fotos se realizaron en un transiluminador y el análisis de las mismas con el software incorporado (GeneSnap, Syngene®).

3.7. Detección y caracterización de los integrones.

Como ya hemos comentado en la introducción, cada integrón tiene una integrasa específica. En nuestro caso buscamos los genes *int1* e *int2* que codifican la integrasas de los correspondientes integrones de tipo 1 y 2, respectivamente.

3.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los cebadores diseñados por Leverstein-Van Hall et al. (2002) fueron los utilizados

para la PCR de *int1*, los descritos por Levesque et al. (1995) para las regiones conservadas nos sirvieron para la amplificación de las casetes (CS). Mientras que para el *screening* del integrón de tipo 2 nos guiamos por Barlow et al. (2004) y por White et al. (2001) para las casetes correspondientes.

Tabla 3.2. Genes, cebadores y tamaño de las secuencias amplificadas.

Genes/referencia	Cebadores y programación	Amplicones (bp)
<i>Int1</i> Leverstein-Van Hall et al. 2002	5'-GCT CTC GGG TAA CAT CAA GG-3' 5'-TCA GGA GAT CGG AAG ACC TC-3' 94° C, 3min.; 30x (94° C, 34s; 54° C, 30s; 68° C, 3min); 68° C, 10min.	242
CS1 Levesque et al. 1995	5'-GGC ATC CAA GCA GCA AG-3' 5'-AAA AGC AGA CTT GAC CTG A-3' 94° C, 3min; 30x (94° C, 30s; 56° C, 30s; 68° C, 3min); 68° C, 10min.	Variable (Tabla 4.10)
<i>Int2</i> Barlow et al. 2004	5'-GCA AAC GCA AGC ATT CAT TA-3' 5'-ACG GAT ATG CGA CAA AAA GG-3' 94°C, 3min; 30x (94°C, 30s; 62°C, 30s; 72°C, 45s); 68°C, 10min.	

La mezcla de PCR se elaboró en los cuatro casos siguiendo esta receta para un volumen final por muestra de 20 µl:

Reactivo a concentración inicial	[final]	Vx muestra
PCR buffer [con MgCl ₂ (2mM)] 10x	1x	2 µl
dNTPs 10mM	0,2 mM	0,4 µl
Primers (2) 10 µM	1 µM	2 µl x 2
DNA polimerasa Biotools 1U/ µl	0,05 U/ µl	1 µl
DNA 1:10		2 µl
H ₂ O		10,6 µl

Las programaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf con las siguientes fases clásicas de la PCR: desnaturalización inicial seguida de 30 ciclos consistentes en: desnaturalización, hibridación y elongación; y, por último, un ciclo de terminación.

El control positivo de *int1* fue una cepa de la propia colección mientras que el de *int2*

procedía de una cepa de *Escherichia coli* O157:H7 cedida por Remigio Martínez (Universidad de Extremadura, Cáceres).

3.7.2 Electroforesis y visualización del ADN.

La electroforesis de los productos de PCR de cada reacción se realizó en un gel de agarosa (Agarose D1 Low EEO, Conda®) en tampón TBE 0,5x (BIO-RAD®): al 1% de agarosa para la PCR de *int*, ya que su producto es un amplicón de pequeño tamaño, mientras que para las PCRs de CS, con amplicones de gran tamaño, se utilizó un gel de agarosa al 0,7%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml, BIO-RAD®) a una concentración final de 0,5 µg/ml.

Se cargaron los geles con 9 µl del producto de PCR junto con 1 µl de tampón de carga (50% de glicerol al 50% en agua + 0,25% azul de bromofenol + 0,25% xilen-cianol FF). Como marcador de peso molecular se utilizó el de 1kb de Invitrogen®. La visualización de los geles se hizo con el sistema Syngene modelo GeneGenius.

3.7.3 Patrones de restricción (RFLP): digestión enzimática con *HaeIII*.

Para discriminar las casetas de los integrones previamente a su secuenciación, evidenciamos los patrones de restricción RFLP mediante digestión con la endonucleasa *HaeIII*, utilizando el siguiente procedimiento: mezclamos 17 µl de producto de PCR purificado (kit de purificación Biotools®) con 2 µl tampón de *HaeIII* y por último 1 µl de la enzima *HaeIII*. Se incubó a 37° C unas 18 horas y después se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio según lo ya expuesto anteriormente.

3.7.4 Secuenciación.

Tras determinar los patrones de CS para nuestra colección de cepas, elegimos un amplicón de cada patrón y se envió a secuenciar. Cuando se trataba de productos de PCR con

varios amplicones los hicimos correr en un gel de agarosa al 1%, cortamos cada banda gracias a un visor UV y las purificamos con el kit ya citado de Biotools®.

La secuenciación se realizó con nuestros propios cebadores en los laboratorios StabVida (Lisboa, Portugal). Los resultados se contrastaron con la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante el programa BLAST (Altschul et al. 1990).

3.8 Genotipo de las beta-lactamasas.

Para cerciorarnos de que las cepas resistentes a las cefalosporinas no portaban ningún gen de resistencia que pudiera estar silenciado o bien presentar tan baja actividad que no pudiese ser detectada la enzima correspondiente en la fase fenotípica del estudio, hicimos un *screening* para los principales determinantes de resistencia a dichos antimicrobianos. Mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) buscamos los genes más frecuentes que codifican beta-lactamasas en bacterias del género salmonella: tanto de espectro extendido (BLEE o ESBL, en el inglés original) como asociados o no a plásmidos: *blaOXA*, *blaTEM*, *blaSHV*, así como los emergentes *blaCTX-M* y *blaCMY*.

Los cebadores utilizados se obtuvieron en la mayoría de los casos de la bibliografía. Las programaciones de los termocicladores, y en su caso el diseño *de novo* (programa Oligos v. 6.0), se indica en la tabla 3.3.

La reacción se preparó para un volumen final de 20 µl igual que para *int* (ver 3.7.1) excepto en la PCR múltiple de *blaCTX-M* (50 µl) (Tabla 3.4).

Los controles positivos para los filogrupos *blaCTX-M* 2 (NC13462.T), 8 (NC12463.T) y 25 (NC13465.T) fueron adquiridos en el National Tissue Culture Collection (NCTC) británico mientras que los correspondientes a los filogrupos 1 y 9 fueron aportados gentilmente por la Dra. Teresa Coque (Hospital Ramón y Cajal, Madrid) y el resto por la Dra. Carmen Torres (Universidad La Rioja, Logroño). Las condiciones de electroforesis fueron en todo caso las mismas que en 3.7.2.

Tabla 3.3. Genes (referencia bibliográfica) con sus respectivos cebadores y el amplicón resultante de la PCR. También se indica programación de PCR utilizada.

Gen/referencia	Cebadores y programación	Amplicón (bp)
<i>blaOXA-1</i> Chen et. 2004	5'-AATGGCACCAGATTCAACTT-3' 5'-CTTGGCTTTTATGCTTGATG-3'	595
	95 °C, 10'; 30x(95°C 30", 55° C 1', 72° 1'); 72°C 7'	
<i>blaTEM</i> Brinas et al. 2002	5'-TTCTTGAAGACGAAAGGGC-3' 5'-ACGCTCAGTGGAACGAAAAC-3'	1.209
	Oligos: 96°C, 3'; 30 x (96°C, 30"; 57,2 °C, 30"; 72 °C, 2'); 72° C, 10'	
<i>blaSHV</i> Essack et al. 2001	5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3' 5'-GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'	874
	95° C 3'; 30x(94°C 15", 60°C 30", 72°, 1'); 72°C 5'	
<i>blaCMY</i> Winokur et al. 2001	5'-ATGATGAAAAAATCGTTATGC-3' 5'-TTGCAGCTTTTCAAGAATGCGC-3'	1.131
	Oligos: 96°C, 3'; 30x (96°C, 30"; 58,6 °C, 30"; 72 °C, 2'); 72 °C, 10'	
<i>blaCTX-M</i> Woodford et al. 2006 PCR múltiple		
	Grupo 1. 5'- AAAAATCACTGCGCCAGT-3' 5'- AGCTTATTCATCGCCACGTT -3'	415
	Grupo 2 5'- CGACGCTACCCCTGCTATT -3' 5'- CCAGCGTCAGATTTTTTCAGG-3'	552
	Grupo 8 5'- TCGCGTTAAGCGGATGATGC -3' 5'- AACCCACGATGTGGGTAGC -3'	666
	Grupo 9 5'- CAAAGAGAGTGCAACGGATG -3' ATTGGAAGCGTTCATCACC -3'	205
	Grupo 25 5'- GCACGATGACATTCGGG -3' 5'- AACCCACGATGTGGGTAGC -3'	327
	94°C, 5'; 30x (94°C, 25"; 52° C, 40"; 72° C, 50"); 72° C, 6'.	

Tabla 3.4. Mezcla de PCR para la reacción múltiple de *bla*CTX-M.

Reactivo a concentración inicial	[final]	Vx muestra
PCR buffer [con MgCl ₂ (2mM)] 10x	1x	5 µl
dNTPs 10mM	0,2 mM	1 µl
Primers (9) 10 µM	1 µM	2 µl x 9
DNA polimerasa Biotools 1U/ µl	0,05 U/ µl	2,5 µl
DNA		2 µl
H ₂ O		21,5 µl

3.9. Determinantes de resistencia para las quinolonas.

Como ya comentamos en la introducción hay descritos cuatro mecanismos de resistencia a las quinolonas en bacterias del género *Salmonella*:

1. Alteración de la diana mediante mutaciones en los genes cromosómicos que codifican las subunidades de la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) o de la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*).
2. Proteínas que impiden la unión ADN girasa y quinolona: QNR.

Y, más recientemente descritos, también asociadas a plásmidos (PMQR) como los genes *qnr* pero bastante menos frecuentes:

3. Modificación enzimática del antimicrobiano (*aac(6')-Ib-cr*).
4. Bombas de eflujo (AcrAB, cromosómica; y QepA, plasmídica).

Las mutaciones en los genes del punto 1, que se ubican en las regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (QRDR), son detectadas mediante comparación de la secuencia de aminoácidos respecto a la QRDR correspondiente de una cepa salvaje. Utilizamos el programa ClustalW2 accesible desde la web <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sequence.html> sobre las secuencias generadas por StabVida (Lisboa, Portugal) a partir de los amplicones que obtuvimos gracias a la correspondiente PCR y purificación de productos con el SpeedTools PCR Clean-Up Kit® siguiendo las instrucciones del fabricante (Biotools). En una primera instancia se analizaron las secuencias de *gyrA* y *parC* (donde más frecuentemente están

descritas mutaciones no silenciosas) de las cepas resistentes a una quinolona al menos. Hicimos idéntico análisis para *gyrB* y *parE* en las estirpes que resultaron negativas a ese primer ensayo. De manera paralela se hizo un screening para todos los determinantes PMQR (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Genes, cebadores, programación, amplicones y referencia para las PCR de los determinantes de resistencia a las quinolonas.

Gen/Referencia	Cebadores/Programación	Amplicón (bp)
<i>gyrA</i> Randall et al. 2005	STGYRA12 CGTTGATGACTTCCGTCAG	471
	STGYRA1 TGTCCGAGATGGCCTGAAGC 95 °C, 5 min; 35x(95 °C, 1min.; 55 °C, 1min.; 72 °C, 1min.); 72 °C, 10 min.	
<i>gyrB</i> Randall et al. 2005	gyrBlo CGGTGATCAGCGTCGCCACTTCC	181
	gyrBup GCGCTGTCCGAAGTACCT 95 °C, 10 min; 30x(95 °C, 1min.; 64 °C, 30s; 72 °C, 1min.); 72 °C, 10 min.	
<i>parC</i> Randall et al. 2005	parClo TAACAGCAGCTCGGCGTATT	270
	parCup CTATGCGATGTCAGAGCTGG 95 °C, 10 min; 30x(95 °C, 1min.; 64 °C, 30s; 72 °C, 1min.); 72 °C, 10 min.	
<i>parE</i> Randall et al. 2005	parElo ATACGGTATAGCGGCGGTAG	240
	parEup TCTCTCCGATGAAGTGCTG 95 °C, 10 min; 30x(95 °C, 1min.; 64 °C, 30s; 72 °C, 1min.); 72 °C, 10 min.	
<i>qnrA</i> Catoir et al. 2007	QnrAm-F AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580
	QnrAm-R TGCCAGGCACAGATCTTGAC 95 °C, 10 min; 35x(95 °C, 1min.; 54 °C, 1min.; 72° C, 1min.); 72 °C, 10 min.	
<i>qnrB</i> Catoir et al. 2007	QnrBm-F GGMATHGAAATTCGCCACTGc	264
	QnrBm-R TTTGCGYGYCGCCAGTCGAAC 95 °C, 10 min; 35x(95 °C, 1min.; 54 °C, 1min.; 72° C, 1min.); 72 °C, 10 min.	
<i>qnrC</i> Wang et al. 2009	qnrC-R TCCACTTTACGAGTTCT	447
	qnrC-F GGGTTGTACATTTATTGAATC 94 °C, 5 min; 30x(94 °C, 30s; 50 °C, 30s.; 72 °C, 30s); 72 °C, 10 min.	
<i>qnrD</i> Cavaco et al. 2009b	qnrD fw CGAGATCAATTTACGGGGAATA	400
	qnrD rev AACAAAGCTGAAGCGCCTG 94 °C, 5 min; 30x(94 °C, 1min.; 50 °C, 1min.; 72 °C, 1min.); 72 °C, 10 min.	
<i>qnrS</i> Catoir et al. 2007	QnrSm-F GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
	QnrSm-R TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG 95 °C, 10 min; 35x(95 °C, 1min.; 54 °C, 1min.; 72° C, 1min.); 72 °C, 10 min.	
<i>qepA</i> Bin Kim et al. 2009	QepA-R GTCTACGCCATGGACCTCAC	596
	qepA-F AACTGCTTGAGCCCGTAGAT 96 °C, 3 min; 30x(96 °C, 30s.; 64 °C, 30s; 72 °C, 2min.); 72 °C, 10 min.	
<i>aac(6')-Ib-cr</i> Park et al. 2006	aacIb-R CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482
	aacIb-F TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA 94 °C, 10 min; 35x(94 °C, 45s.; 55 °C, 45s; 72 °C, 45s); 72 °C, 10 min.	

Para las mezclas de PCR nos ceñimos a la receta ya presentada (3.7.1), del mismo modo que para las condiciones de electroforesis (3.7.2). Las reacciones destinadas a la secuenciación y la PCR múltiple descrita por Catoir et al. (2007) para *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* se realizaron en un volumen final de 50 μ l mientras el resto de reacciones fueron de 20 μ l.

Los controles positivos fueron cedidos por A. Jacoby, Lahey Clinic, Boston, EEUU (*qnrA1*, *qnrS1*, *qnrB1* and *aac(6')-Ib-cr*); L. Cavaco, National Food Institute, Copenhagen, Dinamarca (*qnrD*); M. Wang, Fudan University, Shanghai, China (*qnrC*); y K. Yamane, National Institute of Infectious Diseases, Tokio, Japón (*qepA*).

3.10. Tratamiento estadístico de los datos.

Nos hemos servido de las hojas de cálculo de OpenOffice 3.1 y del programa SPSS 13.0.1 para el tratamiento estadístico y para la representación gráfica de los datos. Para analizar la asociación entre variables cualitativas se empleó el test de la chi-cuadrado - χ^2 -, o la prueba exacta de Fisher cuando fue preciso (valores esperados inferiores a cinco). Para comparar medias se utilizó la prueba *t* de Student o el análisis de la varianza. Cuando las varianzas no fueron homogéneas, según la prueba de Levene, se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney para dos muestras o Kruskal-Wallis para más de dos muestras). También se utilizó la prueba no paramétrica de la mediana cuando los datos se distribuían de manera sesgada o muy dispersa.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson cuando se relacionaron entre sí variables cuantitativas. En todos los contrastes las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con valores de $P < 0,05$.

4. Resultados.

4.1. Ceparío.

Como ya comentamos en el capítulo de material y métodos, el ceparío se compuso finalmente de 203 cepas procedentes de Extremadura (14 de Cáceres y 98 de Badajoz) y Andalucía (n=91), aisladas en las Facultades de Veterinaria de las Universidades de Córdoba (n=131), Complutense de Madrid (n=63) y Extremadura (n=9).

Tabla 4.1. Número de aislados en cada uno de los sistemas de cría contemplados. En el caso de porcino ibérico (PI) se especifica tipo de alimentación en la fase de engorde final.

Régimen	N
Compañía	4
Extensivo	11
Intensivo	66
Montanera (PI)	66
Recebo (PI)	8
Cebo (PI)	21
Silvestre	17
Desconocido	10
Total	203

Los aislados provenían de 14 especies animales (mamíferos, aves y reptiles) de los diversos sistemas de explotación (compañía, producciones intensiva y extensiva) y fauna silvestre (Tablas 4.1 y 4.2 y anexos). Hemos codificado como una única variable todos los aislados provenientes de avicultura independientemente de que se tratara de gallinas de puesta, pollos de engorde o granjas de reproductoras. Sin embargo, en el caso del porcino se ha considerado como grupos diferentes al ganado ibérico (n=103) del blanco (n=42) por los diferentes sistemas de manejo que han existido tradicionalmente para ambos troncos raciales. La mayor parte de las muestras (82%) habían sido tomadas en matadero y granja (es decir, a partir de animales que no han exteriorizado la enfermedad). En total, de animales aparentemente sanos provenían 134 muestras de porcino, 26 de avicultura y 3 de vacuno.

Tabla 4.2. Frecuencia de presentación de las distintas serovariedades en función de la especie hospedadora.

Serotipos	Avicultura	Silvestres	Otros	Porcino Ibérico	Porcino Blanco	TOTAL
4,12:b:-			Ovino			1
4,5,12:i:-		Perdiz		16	1	18
47:i:z53				2		2
IIIb47:k:z35			Varano			1
Abony			Vacuno			1
Abortusovis			Ovino (3)			3
Agona			Vacuno			1
Anatum	5	Cigüeña (2)	Vacuno	5	1	14
Brandenburg					6	6
Bredeney		Cigüeña		4	2	7
Choleraesuis		Jabalí		4	1	6
Derby				10		10
Enteritidis	11	Cigüeña Jabalí	Pitón			14
Essen				3		3
Goldcoast					1	1
Hadar	5				1	6
Hindmarsh				5		5
Infantis	4					4
Istanbul				2		2
London				2		2
Mikawasima		Buitre negro		5		6
Montevideo				5		5
Othmarschen	1					1
Rissen			Vacuno	3	11	15
Tomegbe				6		6
Typhimurium	1	Cigüeña Halcón Perdiz (6) Codorniz	Canario (2) Equino (2)	31	18	63
TOTALES (n=26)	27	17	14	103	42	203

En cuanto a **fagotipos** (Tabla 4.3), la mayor parte de las cepas de *S. Typhimurium* DT 104b procedían de cerdo blanco (11 de 14) con ningún aislado de porcino ibérico. Mientras que los fagotipos 193 (27 de 29) y U311 (10 de 11), tanto de cepas monofásicas como bifásicas de *S. Typhimurium*, habían sido aislados mayormente de porcino ibérico. Para el resto de especies y serotipos no había un número de casos suficiente como para encontrar relaciones estadísticamente significativas (ver en anexos tablas con todos los datos).

Tabla 4.3. Frecuencia de presentación de los fagotipos.

S. Typhimurium (mono y bifásica)		S. Enteritidis		S. Hadar	
Fagotipos	N	Fagotipos	N	Fagotipos	N
15a	1	1	6	1	1
29	1	4	1	2	3
40	1	7	1	15	2
104	1	33	1		
104b	14	35	2		
NT	7	PNR/NT	2		
137	1				
193	29				
195	2				
203	1				
204a	2				
204c	1				
208	1				
U302	6				
U310	1				
U311	11				

Esta composición del cepario nos ha permitido realizar un análisis comparativo entre serovariedades (n=26). Para dicho análisis normalmente hemos considerado como variable independiente las 8 serovariedades con n>5 de procedencia distinta al cerdo blanco, agrupando a las restantes bajo el epígrafe **otras**. Siguiendo el mismo criterio para las cepas de origen porcino blanco multirresistentes antes mencionadas, tan sólo tres serovariedades reunían más de cinco casos: Typhimurium, Brandenburg y Rissen.

4.1.1 Dispersión clonal.

Gracias a la técnica del campo pulsado (PFGE) nos “aproximamos” a las relaciones clonales de la colección. Tan sólo 5 aislados (2,5%) no fueron tipificables (NT) por esta técnica. Algo habitual por otra parte tanto en estudios realizados sobre *Salmonella* spp. como otras especies y que podría estar motivado por una mayor actividad endonucleolítica en estas cepas (Téllez, 2003). Consideramos el criterio más restrictivo posible a la hora de interpretar los resultados y en ningún caso patrones de bandas distintos fueron considerados dentro de un mismo pulstipo como en ocasiones recomienda la literatura (Tenover et al. 1995). Si bien es cierto que siendo estrictos no siempre podemos hablar indistintamente de clon o pulstipo pues estudios biomoleculares posteriores han demostrado diferencias genéticas dentro de un

mismo patrón de bandas (pulsotipo). Por lo tanto cuando hablemos de clon nos referiremos únicamente a cepas con idéntico patrón de bandas y ninguna diferencia genética detectada en nuestros ensayos.

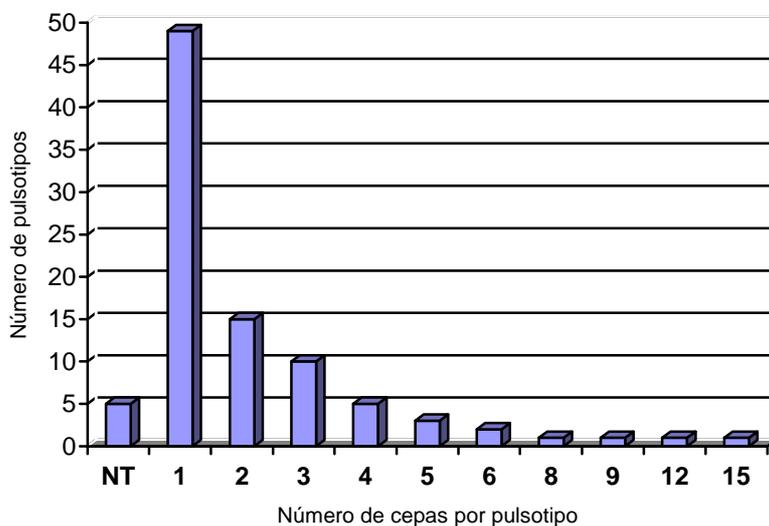


Figura 4.1. Recuento de pulsotipos (N) compartidos por distinto número de cepas (de 1 a 15/cepas pulsotipo) incluidas las no tipificables (NT)

Se detectaron un total de 85 pulsotipos (Figura 4.1). Prácticamente la mitad de los mismos (n=38) procedían de las serovariedades mono y bifásica de *S. Typhimurium* con una similitud entre el 95,7 y el 33,3% mientras que el resto de serotipos presentaron una similitud global de entre el 96 y el 21,1% (ver dendogramas en anexos).

Las cepas de *S. Hadar* y *S. Istanbul* están muy próximas filogenéticamente (90% de similitud) prácticamente igual que las serovariedades Bredeney y Brandenburg (89,7%). Un 17% de los pulsotipos han sido idénticos para cepas del mismo serotipo: Rissen, n=15; Hadar, n=6; Montevideo, n=5; Hindmarsh, n=5; Istanbul, n=2; y London, n=2. Las cepas de *S. Infantis*, *S. Essen*, *S. Bredeney* y *S. Anatum* mostraron también una gran homogeneidad (similitud por encima del 95%). Sin embargo podemos hablar en general de un cepario muy heterogéneo. La cuarta parte (n=49) de los aislados se corresponden con pulsotipos únicos. Con tan sólo otro pulsotipo, aparte del citado de *S. Rissen*, compartido por más de 10 cepas (TY09, n=12) y cuatro con más de cinco aislados (EN02, n=9; HA1, n=6; TY13, n=8; TY65, n=6).

Si bien lo más habitual es la adscripción de estos pulsotipos a determinadas especies, diez casos han sido aislados de al menos dos especies de hospedadores distintas (Tabla 4.4.). Observamos, así mismo, que apenas hay clones/pulsotipos circulantes entre las dos subpoblaciones de cerdo estudiadas (blanco e ibérico), más allá de los pulsotipos RI1 de *S. Rissen*, CH2 de *S. Choleraesuis* y , TY13 de *S. Typhimurium* no coincidiendo (de conocerse) fagotipos.

Tabla 4.4. Cepas (número entre paréntesis) de mismo pulsotipo aisladas de dos hospedadores distintos al menos.

Serotipo	Pulsotipo	Fagotipo	Especies	Lugares	Años
Anatum	AN10		Vacuno (1), avicultura (3)	Badajoz, Cáceres	2005 2007
	EN01	1	Jabalí (1), avicultura (1)	Andalucía	1998 2007
Enteritidis	EN02	1	Avicultura (3), cigüeña (1)	Andalucía, Cáceres	2007 2008
		PNR	Avicultura (1)	Andalucía	2007
		4	Avicultura (1)	Andalucía	2007
		7	Avicultura (1)	Andalucía	2007
		35	Avicultura (2)	Andalucía	1997 2007
Hadar	HA1	2	Avicultura (2), porcino blanco (1)	Andalucía	2003 2007
		1	Avicultura (1)	Andalucía	2007
		15	Avicultura (2)	Andalucía	2007
Rissen	RI1		Porcino blanco (11), ibérico (3), vacuno (1)	Andalucía, Badajoz, Cáceres.	2003 2004 2007
		U302	P. blanco (3), equino (1)	Andalucía	2003 2004
Typhimurium	TY13	193	P. ibérico (3)	Badajoz	2007 2008
		203	P. ibérico (1)	Cáceres	2006
		104b	Perdiz (1), codorniz (1)	Andalucía	1998
	TY43	104	Canario (1)	Andalucía	1997
		U302	Perdiz (1)	Andalucía	2000
	TY48	29	Porcino blanco (1)	Andalucía	2004
		193	Perdiz (1)	Andalucía	2004
		204a	Perdiz (1)	Andalucía	2004
Choleraesuis	CH2		Porcino blanco (1), porcino ibérico (2)	Badajoz y Cáceres	2007 2008

Siete de estos diez pulsotipos han sido aislados de diversas especies de aves, en cuatro casos de avifauna silvestre, como perdiz roja (*Alectoris rufa*), codorniz (*Coturnix coturnix*) y cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*), y en otro de jabalí (*Sus scrofa*). El resto de aislados de animales salvajes, bien de supuesta vida libre bien de compañía -como un caso de varano (*Varanus* sp.) y otro de pitón (*Python* sp.)- no compartían patrones de restricción con otras cepas aisladas de animales domésticos.

Prácticamente todos estos pulsotipos han sido aislados en diversos años tanto a partir de animales sanos como de casos clínicos. Llama la atención en este aspecto el pulsotipo EN02 de *S. Enteritidis*. Su primer aislamiento data de 1997 a partir de un huevo de gallina en la UCO, donde se volvieron a aislar cepas en 2007 tanto a partir de animales sanos (muestras de polvo y heces de explotaciones, también en matadero) como de casos clínicos. Por último, el aislamiento de 2008, gracias al equipo de Alonso y Rey de la UEX, procede de una cigüeña blanca de primoingreso en el Centro de Recuperación de Fauna “Los Hornos” (Sierra de Fuentes, Cáceres).

También en *S. Typhimurium* encontramos pulsotipos con amplia dispersión temporal y geográfica. Por ejemplo, TY13 aparece por primera vez en nuestra colección en 2003 procedente de una muestra de cerdo blanco de un matadero de Andalucía, además de darse ese mismo año un caso clínico, situación que se repetiría en 2004 con un caso en porcino blanco y otro en ganado equino (las cuatro cepas del fagotipo U302). La cepa de 2006, de distinto fagotipo (203), fue aislada de un caso clínico de cerdo ibérico en la UCO. Los tres últimos aislamientos en 2007 y 2008 proceden de muestras de mataderos pacenses de cerdo ibérico tanto de cebo como montanera fruto de los trabajos de la UCO y la UCM, tratándose en los tres casos del mismo fagotipo (193).

De las 15 cepas del pulsotipo RI01 de *S. Rissen* (único de esta serovariedad) las 11 primeras (de 2003) proceden de muestras en matadero de cerdos blancos sacrificados en Andalucía entre 2003 y 2004. Las tres cepas de 2007 proceden de cerdos ibéricos de Badajoz y la última, en 2008, de un bovino sacrificado en Cáceres.

4.2. Fenotipo de resistencia.

4.2.1. En función de la especie de aislamiento.

Como ya se expuso anteriormente, consideraremos de manera diferenciada los datos de resistencia a los antimicrobianos según procedan las cepas de cerdo blanco o del resto del cerpario por proceder las primeras de un muestreo dirigido (Figura 4.2).

En general, el antimicrobiano al que más resistencia han presentado las diversas cepas ha sido la tetraciclina (61,6% de cepas resistentes entre las aisladas de animales distintos al cerdo blanco), seguida por sulfametoxazol+trimetoprim (54,3%), el sulfametoxazol solo (52,4%), la estreptomicina (52,4%), y la ampicilina (46,9%).

En otros **aminoglicósidos** distintos a la estreptomicina encontramos también tasas de resistencia superiores al 20%, como es el caso de la kanamicina (33,6%), de la gentamicina (34,8%) y sobre todo de la estreptomicina (54,3%). El aminocíclico (relacionado con los aminoglicósidos) espectinomicina presenta unas tasas bajas de resistencia (23,8%). Neomicina y apramicina presentan tasas de resistencia aun menores (15,9% y 3,1%, respectivamente). Las resistencias frente a la gentamicina, la neomicina y la kanamicina son mayores entre las cepas aisladas de avicultura intensiva que entre las aisladas de porcino (ibérico), aunque el caso contrario se observa para la resistencia a la estreptomicina y a la mayor parte de los antimicrobianos (Figura 4.2).

Para los **beta-lactámicos** se detectan tasas de resistencia mayores en general dentro del grupo de cepas aisladas de las “demás especies”, lo cual puede deberse, como en el resto de antimicrobianos, a que la mayor parte de ellas proceden de casos clínicos (30 de 33). De hecho el 86% de los aislados de casos clínicos se incluyen en dicho grupo. También son cercanas al 50% las tasas de resistencia a la amoxicilina y amoxicilina-clavulánico en el cerdo ibérico. La distribución de los valores de CMI para los beta-lactámicos de utilización terapéutica más antigua (AMP, AMX y AMC) responde a un patrón característico (Figura 4.3). La mayor parte de las cepas presentan valores de CMI para la ampicilina y la amoxicilina en los extremos del rango de concentraciones ensayadas. Sin embargo, la combinación de la amoxicilina con el ácido clavulánico da lugar a una distribución de la sensibilidad con unos

valores de CMI sensiblemente inferiores, sobre todo para el extremo superior del rango de concentraciones, aumentando en los valores intermedios.

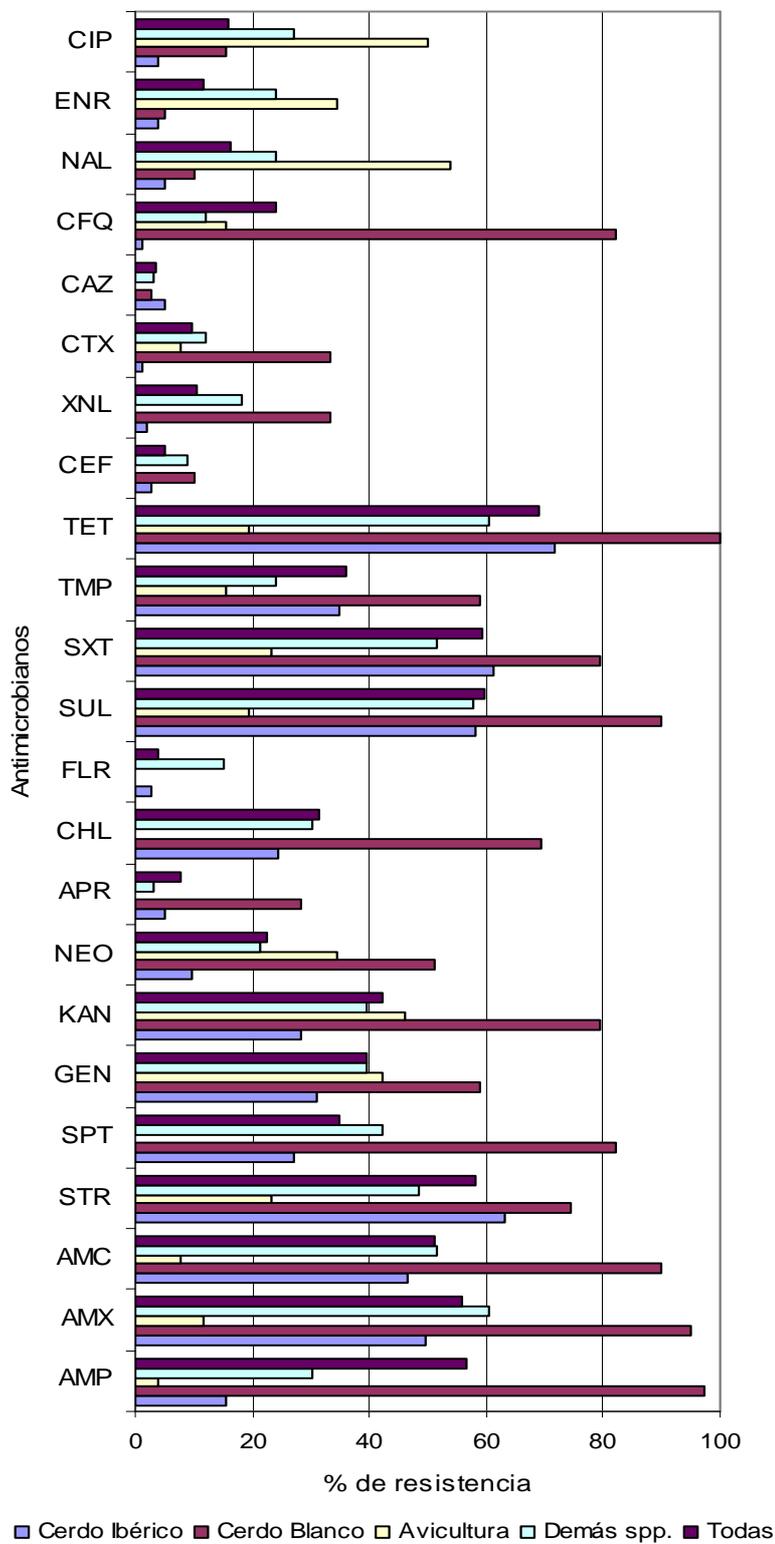


Figura 4.2. Porcentaje de cepas resistentes a cada uno de los antimicrobianos ensayados.

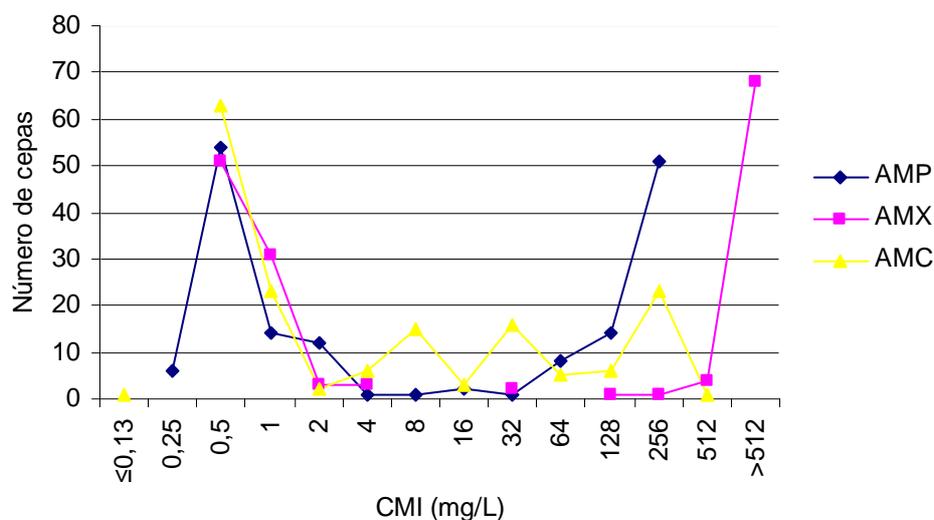


Figura 4.3. Distribución de las distintas cepas de *Salmonella* en función de su CMI frente a la ampicilina (AMP), la amoxicilina (AMX) y la amoxicilina-clavulanato (AMC).

Para las **quinolonas** observamos cómo la resistencia del cepario se concentra en los aislados de origen avícola, incluso por encima de las tasas de resistencia del grupo “demás especies” donde se concentran la mayoría de los aislamientos clínicos, más expuestos en teoría a tratamientos antibióticos.

En general las bacterias de este cepario se han mostrado bastante sensibles a las **cefalosporinas**, con tasas de resistencia por debajo del 20% en todos los casos. De hecho tan sólo superan este límite los aislados de cerdo blanco, con una altísima resistencia a la cefquinoma (82,1%), más incluso que para compuestos más antiguos (recordemos que se trata de una cefalosporina de cuarta generación).

4.2.2. Por serovariedades, fagotipos y pulsotipos.

Destacan por sus tasas de resistencia los serotipos Typhimurium y 4,5,12:i:- (variante monofásica de la primera) y Choleraesuis a todos los antimicrobianos en general sobre todo

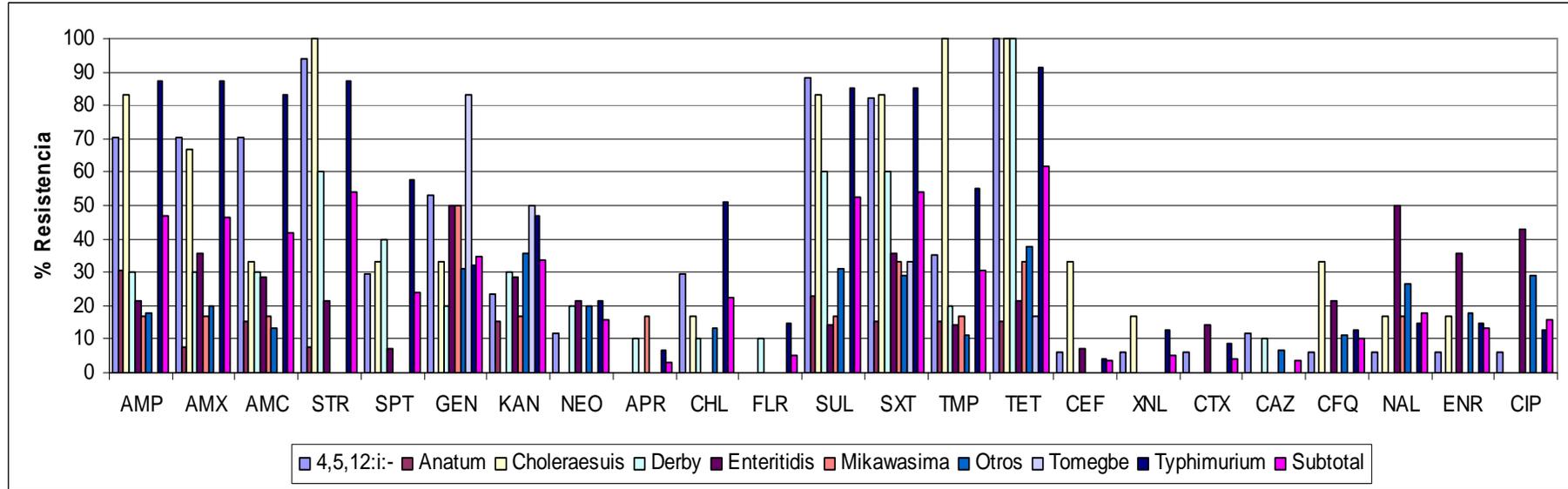


Figura 4.4. Porcentaje de cepas de cada serovar resistentes a los distintos antimicrobianos testados. No se incluyen las aisladas de cerdo blanco.

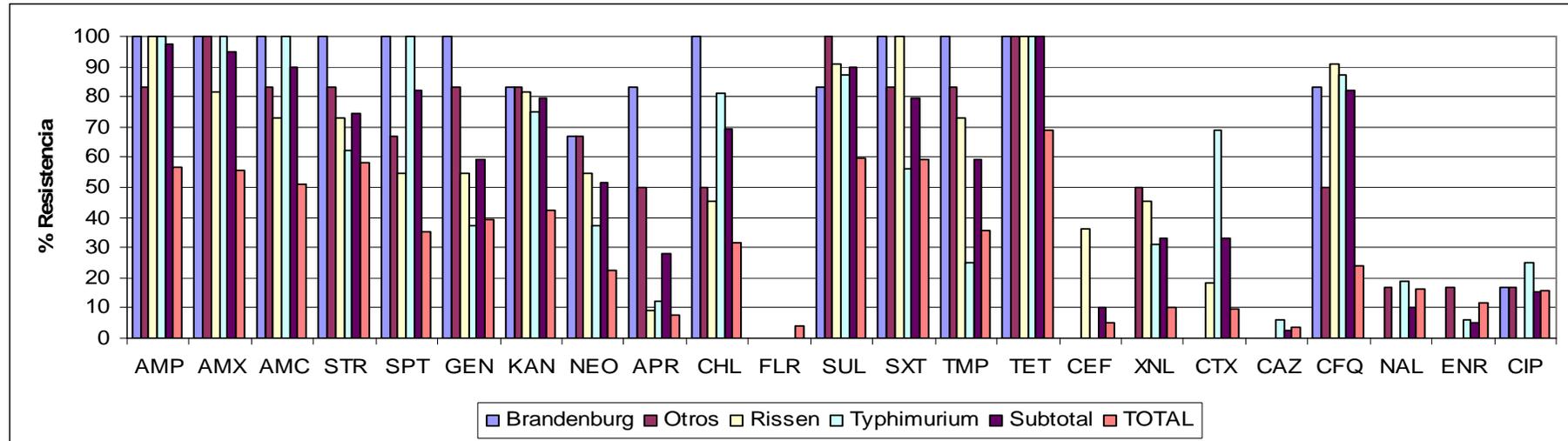


Figura 4.5. Porcentaje de cepas aisladas de cerdo blanco resistentes a los distintos antimicrobianos testados.

frente a los beta-lactámicos, sulfamidas y tetraciclina (Figura 4.4). Así se observa como *S. Choleraesuis* es la serovariedad más resistente a las cefalosporinas: cefalotina, ceftiofur y cefquinoma. Las cepas de los tres serotipos han sido aisladas fundamentalmente en cerdo ibérico (tanto en matadero como de casos clínicos).

Por otro lado las serovariedades Mikawasima y Derby, también aisladas casi en un 100% de cerdo ibérico, presentan tasas de resistencia menores (sobre todo el primero) excepto para la gentamicina (50% resistencia). El serotipo que muestra una mayor sensibilidad es Tomegbe, aunque para la gentamicina (83,3%) y kanamicina (50%) es el más resistente.

S. Enteritidis también es bastante sensible excepto para cefalosporinas (cefotaxima y cefquinoma) y sobre todo quinolonas, con resistencias del 50%, 35,7% y 42,9% frente a nalidíxico, enrofloxacina y ciprofloxacina, respectivamente. En cuanto a las cepas multirresistentes aisladas de cerdo blanco, destacan las seis cepas de Brandenburg como las menos sensibles a todos los antimicrobianos salvo a las cefalosporinas con la única excepción de la cefquinoma, donde presenta tasas de resistencia -al igual que *S. Rissen* y *S. Typhimurium*- superiores al 80%.

El análisis comparativo de la resistencia agrupando las cepas por **fagotipos** muestra que, considerando únicamente los que presentan más de 5 casos, se da la misma situación general descrita para los serotipos en los que se circunscriben. Por ejemplo, *S. Enteritidis* PT 1 es un fagotipo muy sensible a los antimicrobianos en general excepto para los **aminoglicósidos** kanamicina y gentamicina y para las **quinolonas**. Los fagotipos más resistentes son los de *Typhimurium*: DT 104 y 104b, aislados de cerdo blanco principalmente (11 de 15), se muestran especialmente resistentes a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina+clavulanato, tetraciclina, sulfametoxazol, cloranfenicol y espectinomicina. Estos fagotipos son además moderadamente resistentes a la gentamicina y totalmente sensibles a la neomicina. Para las **cefalosporinas** tan sólo muestran más resistencia a la cefotaxima y a la cefquinoma, para el que 2/3 de las cepas son resistentes. Por el contrario resultó ser testimonial la resistencia a las quinolonas entre los fagotipos de *S. Typhimurium*. Cuatro de las cepas resistentes a florfenicol del cepario son fagotipo 104b (Tabla 5.1), presentando tres pulsotipos distintos.

Los 29 aislados de *S. Typhimurium* DT 193 (27 de porcino ibérico) muestran perfiles de multirresistencia muy regulares, con altas tasas de resistencia a tetraciclina, sulfametoxazol además de sulfametoxazol+trimetotrim. En este último antimicrobiano difiere con el fagotipo DT104b, que se mostró sensible frente al mismo. Sin embargo, ambos fagotipos presentan mayor resistencia a estreptomicina que a espectinomicina. Se observa una alta sensibilidad a cefalosporinas y quinolonas excepto una cepa (C54, caso clínico de perdiz) con resistencia a 19 antimicrobianos (máxima MDR) y resistente a las tres quinolonas, además de a ceftiofur, cefotaxima y cefquinoma.

Las cepas del fagotipo U311 (todos los aislados menos uno de cerdo ibérico) son algo más sensibles pero se mantiene la tónica general: la mayoría son resistentes a la tetraciclina, las ampicilinas, la estreptomicina, el sulfametoxazol y el sulfametoxazol más trimetoprim. Se detecta menos resistencia a la gentamicina, y prácticamente total sensibilidad a las cefalosporinas y las quinolonas; excepto una cepa (aislada de cerdo blanco) resistente a la cefotaxima y la cefquinoma.

Uno de los **pulsotipos** que más cepas comprende (dentro de la gran diversidad de perfiles de macrorrestricción detectados por PFGE) es *S. Enteritidis* EN02, con 9 aislados. Este pulsotipo no tiene un patrón de resistencia definido ya que las nueve cepas presentan perfiles de resistencia distintos, desde sensibilidad total hasta multirresistencia frente a 10 antimicrobianos. Lo mismo sucede con *S. Hadar* HA1, si bien para este serotipo hay ciertas semejanzas entre cepas (n=6). Por ejemplo, todas presentan multirresistencia incluyendo una notable pérdida de sensibilidad a todas las quinolonas tanto fluoradas como no fluoradas y el único aislado procedente de cerdo (el resto procede de avicultura) es el más resistente. El único pulsotipo de *S. Rissen* muestra dos tipos de perfiles de antibiorresistencia: un grupo de 9 cepas multirresistentes (aisladas de cerdo blanco) con resistencias similares y otro grupo de cepas más sensibles aisladas de cerdo ibérico y vacuno.

Por otro lado, los pulsotipos de *S. Typhimurium* son más regulares: TY09 (casi todos encuadrados en el fagotipo DT104b) presentan un perfil de multirresistencia regular de 8 a 14 antimicrobianos; TY13, a pesar de su variada procedencia (MDR de 8 a 16), y el clon TY65 (todos de cerdo ibérico y DT193) resistente a entre 5 y 6 antimicrobianos.

4.2.3. Resistencia fenotípica en relación al sistema de explotación.

Analizando los datos que no provienen de la subcolección de cerdo blanco y clasificando los casos en función del grado de intensificación: asignando 1 a montanera, 2 a recebo y cebo –en los tres casos procedentes de cerdo ibérico-, 3 a intensivo y 0 a todos los demás podemos realizar una serie de análisis estadísticos que nos permitan discernir hasta qué punto el sistema de manejo, independientemente de la especie animal o dentro de las distintas especies (para el cerdo ibérico), influye en la pérdida de sensibilidad a los antimicrobianos. Hacemos un análisis mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para las cuatro muestras independientes, estableciendo el rango de CMI en función de la intensificación (0-3).

El resultado es estadísticamente significativo excepto para la apramicina, la cefotaxima, el trimetoprim-sulfametoxazol y el trimetoprim ($P < 0,05$). Para algunos antimicrobianos (la ciprofloxacina, la enrofloxacina, el ácido nalidíxico y la neomicina) la menor sensibilidad se encuentra entre las cepas aisladas de granjas más intensificadas, para el resto nos encontramos con que puede ser cualquier grupo el que presente mayor resistencia: los aislados procedentes de cerdos acabados en montanera son los menos sensibles a la tetraciclina, la ampicilina, la amoxicilina-clavulánico y la estreptomina. Los del grupo de cebo+recebo son los aislados más resistentes a la ceftazidima, el ceftiofur y la gentamicina. Mientras que el resto de cepas (grupo 0) son las más resistentes al sulfametoxazol, la cefquinoma, la cefalotina, la amoxicilina, el florfenicol, el cloranfenicol y la espectinomicina (Figura 5.6).

Aplicamos el mismo análisis sobre cómo influye la intensificación en las resistencias de ciertos serotipos a los antimicrobianos. Únicamente podemos realizar la prueba con aquellas serovariedades que tienen un número de cepas óptimo en al menos dos grados de intensificación. Las cepas de *S. Typhimurium* pertenecientes al grupo 0 (mayoría de muestras procedentes de casos clínicos) son por término general más resistentes a la neomicina, la kanamicina, la getamicina, el cloranfenicol, el florfenicol, el ácido nalidíxico, la enrofloxacina y la ciprofloxacina. Sin embargo, para este mismo serotipo se observa una mayor resistencia a

la amoxicilina-clavulanato cuando proceden de cerdo ibérico en montanera.

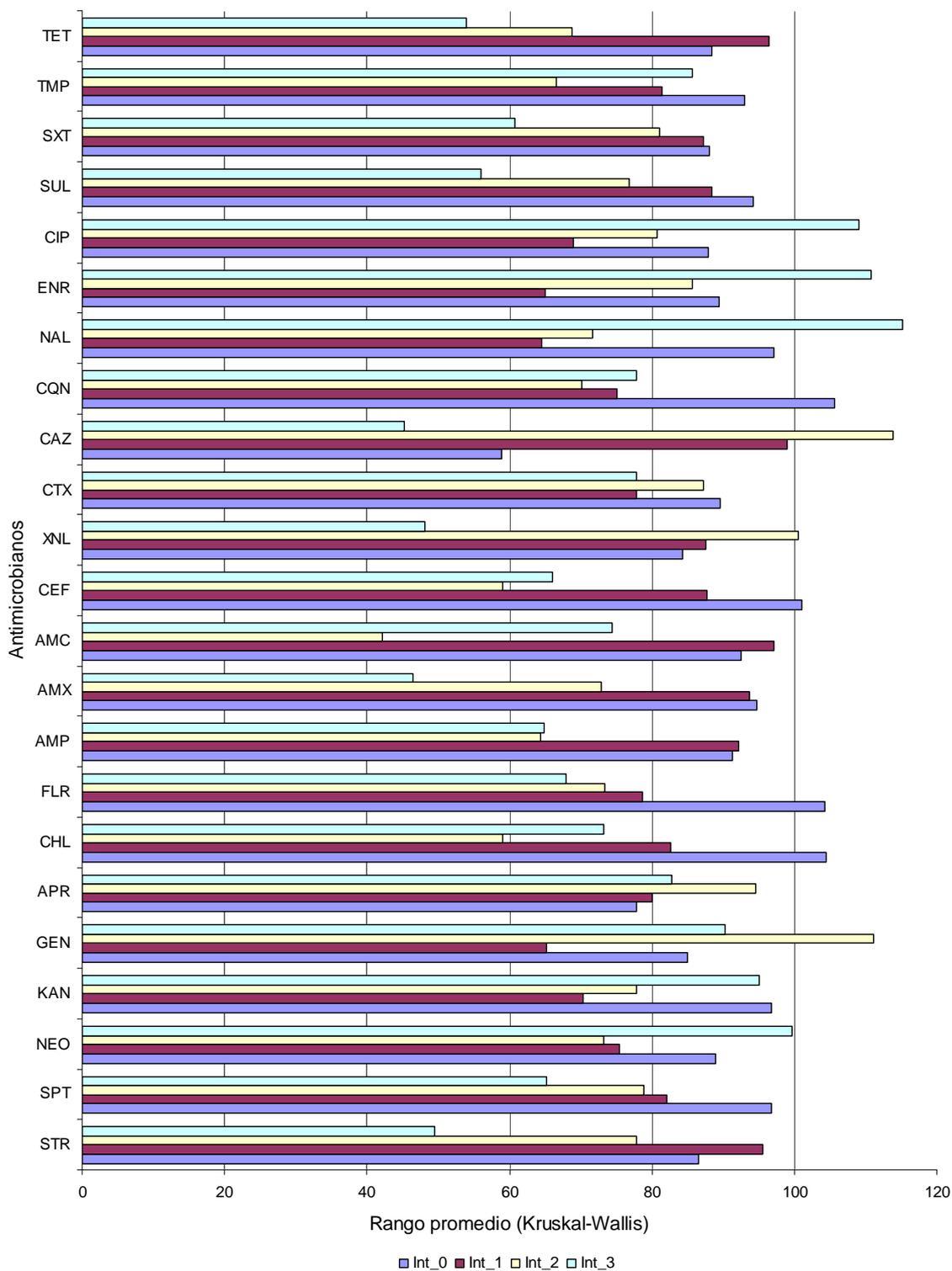


Figura 4.6. Rangos promedio de CMI para los diversos grados de intensificación (de 0 a 3), excluyendo cerdo blanco, según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

En *S.* 4,5,12:i- tan sólo podemos comparar los aislados de montanera con los de cebo+recebo, resultando mayor el rango promedio de CMI para la gentamicina, el sulfametoxazol-trimetoprim y la espectinomicina entre las cepas del primer grupo mientras que, otra vez, la mayor resistencia a la amoxicilina-clavulanato se da en el grupo 1 (montanera). Para el resto de antimicrobianos no obtuvimos resultados estadísticamente significativos

4.2.4. Multirresistencia y perfiles de resistencia.

Al analizar el número de antimicrobianos a los que las cepas muestran resistencia simultánea se puede comprobar el grado de multirresistencia de los distintos serovares. Se considera multirresistente (MDR, del inglés original) a toda cepa con resistencia a cuatro o más antimicrobianos. Así, se observa como *S.* Anatum es el serotipo más sensible, ya que 8 de 13 cepas no presentan resistencia a ningún antimicrobiano, mientras que *S.* Typhimurium, en el otro extremo, se caracteriza por concentrar la resistencia a 5 ó más antimicrobianos (Figura 4.7).

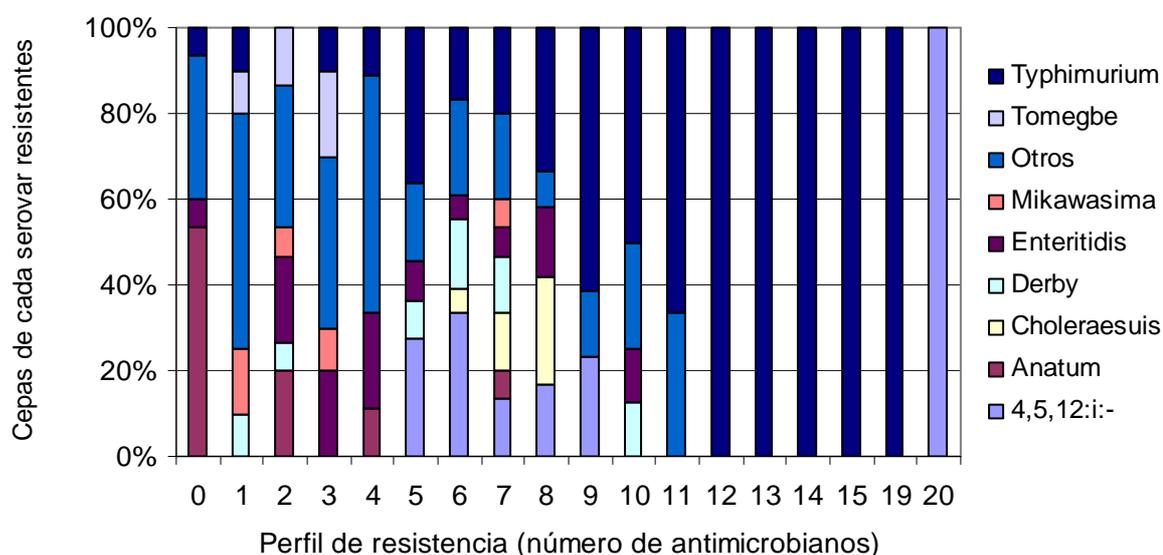


Figura 4.7. Distribución de la resistencia frente a los antimicrobianos del panel entre los distintos serovares. No se incluyen las cepas aisladas de cerdo blanco.

En la colección analizada en este trabajo se calcula que la multirresistencia alcanza el 63,4% de las cepas, excluyendo las aisladas de cerdo blanco. Los serotipos aislados

principalmente de cerdo ibérico (4,5,12:i:-, Choleraesuis, Typhimurium y Derby) son los que han presentado mayor porcentaje de multirresistencia (100, 100, 91,5 y 70%, respectivamente). En el extremo opuesto se sitúan las cepas de *S. Tomegbe* (0%) o *S. Mikawasima* (1 cepa resistente aislada de buitre negro, *Aegyptus monachus*). Las primeras cepas se agrupan en un par de pulsotipos mientras que los cinco aislados serotipados como *Mikawasima* parecen ser un mismo clon. En todos los casos proceden de cerdo ibérico de diversos sistemas de acabado (montanera, cebo y recebo).

Tabla 4.5. Perfiles de resistencia obtenidos tras los ensayos de susceptibilidad frente a 23 antimicrobianos. Sólo se muestran los perfiles compartidos por al menos dos cepas distintas.

Perfil	N	Serovares	Cepas
AMP-AMX-AMC-STR-GEN-SUL-SXT-TET	3	4,5,12:i:- (2), Typhimurium	MP38, MP39, FVC7
AMP-AMX-AMC-STR-KAN-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	2	Hindmarsh (2)	MP46, MP47
AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TET	3	Typhimurium	C06, C07, C03
AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SPT-CHL-SUL-TET-CTX-CFQ	2	Typhimurium	P22, CP06
AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	6	Bredeney, Rissen, Brandenburg (4)	P07, P32, P35, P36, P38, P39,
AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL-CTX-CFQ-NAL-ENR-CIP	3	Typhimurium	P57, C54, C56
AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	6	Typhimurium	CP67, CP64, CP02, CP03, CP05, CP61
AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TMP-TET	4	Typhimurium DT193 & DTU302, Choleraesuis	CP60, CC68, FVC8, C51
AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET	7	Typhimurium DT193, Bredeney, Derby, 4,5,12:i:- DTU311 & DT193	CP24, CP50, CP49, CP31, CP32, CP45, CC62
AMP-AMX-AMC-STR-SUL-TET	5	Typhimurium DT193, Derby, 4,5,12:i:- DTU311	CP28, CP29, CP20, CP25, CP26,
AMP-AMX-AMC-STR-SXT-TET	2	4,5,12:i:- DT311, Typhimurium DT193	CP30, MP55
AMP-AMX-STR-SUL-SXT-TMP-TET-CEF	2	Choleraesuis	MP19, MP51
GEN	9	Montevideo (3), Typhimurium, London, Mikawasima, Tomegbe (2), Infantis	MP01, MP03, MP10, MP25 MP27, MP29 MP30, MP33 SAV01
KAN-GEN	3	Enteritidis, Mikawasima, Tomegbe	SAV20, MP48, MP52
NEO	2	Essen, Typhimurium	MP12, C29
STR-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	3	4,5,12:i:- (2), Choleraesuis	MP22, MP24, MP34
STR-KAN-GEN	2	Bredeney, Tomegbe	MP26, MP46
SXT-NAL-ENR-CIP	2	Enteritidis, Essen	SAV17, MP16
TET	4	Mikawasima, Rissen, Derby (2)	CP56, MP07, CP47, CP55

Las cepas aisladas de cerdo blanco no sólo son multirresistentes sino que además la mayor parte se agrupan en el rango de resistencia de 11 a 14 antimicrobianos (71% de la subcolección). Precisamente en ese subgrupo se encuentra representado uno de los perfiles de multirresistencia más común en este cepario: AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET (n=6), junto a AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET (n=7) y AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET (n=6). El primero se debe a cuatro aislamientos de un clon de *S. Brandenburg*, otra cepa *S. Rissen* y una *S. Bredeney*. Mientras, el segundo perfil lo presentan siete cepas de seis serotipos o serotipos/fagotipos distintos. Por último, el tercer perfil se lo debemos a seis cepas de *S. Typhimurium* DT193 que, aparentemente, podrían tratarse de un mismo clon a pesar de presentar cuatro pulsotipos distintos. Del resto de perfiles de antibiorresistencia (hasta 137, ver anexos), tan sólo 19 son compartidos por más de una cepa (Tabla 4.5.).

Al analizar la sensibilidad frente a 23 antimicrobianos las probabilidades de repetir patrones de resistencia disminuyen en la misma medida que aumentan las combinaciones de antimicrobianos posibles. Si rastreamos en combinaciones de antimicrobianos concretas dentro de estos perfiles se pueden hacer análisis más precisos sobre todo de cara a establecer su relación con determinantes de resistencia (Figura 4.8).

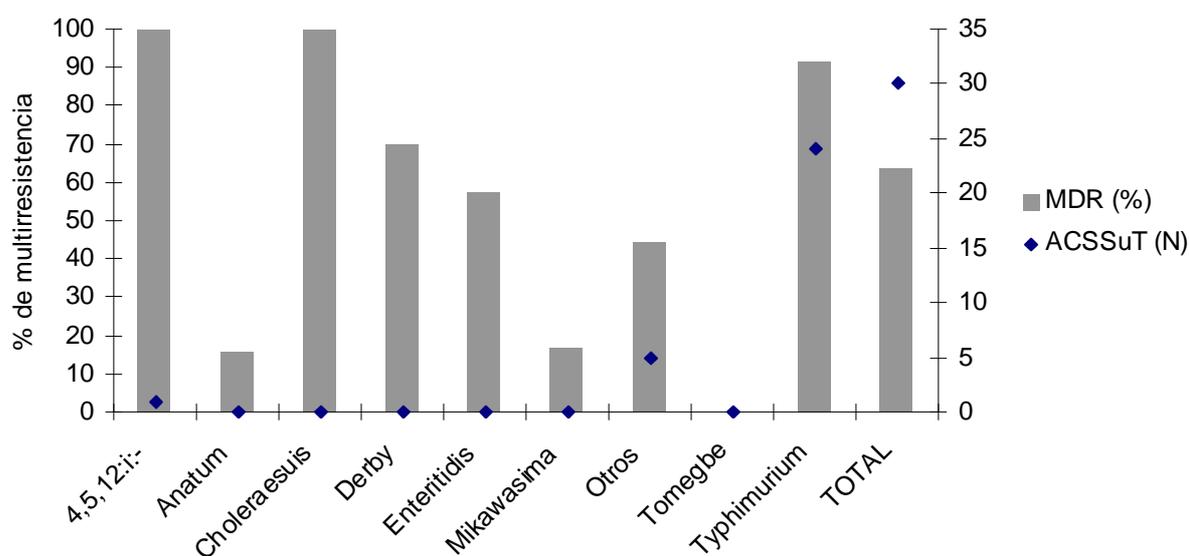


Figura 4.8. Porcentaje de multirresistencia (MDR>3 antimicrobianos) y número de perfiles de pentarresistencia (AMP-CHL-STR-SUL-TET) de cada serovar con más de cinco aislados. Excluidos los aislados de cerdo blanco.

Por ejemplo, la pentarresistencia ACSSuT (AMP-CHL-STR-SUL-TET) se da en un 24,1% del cepario. El porcentaje aumenta al doble (48,7%) si se consideran solo las cepas multirresistentes aisladas del cerdo blanco, y disminuye al 18,3% entre el resto de cepas. No todos los serotipos contribuyen igual a esta tasa. A pesar de haber una relación clara con el número de antimicrobianos a los que se presenta resistencia (Correlación de Pearson=0,660, P=0,000) vemos como las cepas monofásicas de *S. Typhimurium* (a pesar de su 100% de multirresistencia) tan sólo una presenta la pentarresistencia. En el extremo opuesto, las variantes bifásicas: 23 de 47 presentan el perfil referido.

En cuanto a las serovariedades de la subcolección de cerdo blanco, presentan la pentarresistencia todos los serovares, encabezados por *S. Brandenburg*, en 5 de sus 6 cepas, y entre un 30 y un 50% de las cepas del resto de serovares (Figura 4.9).

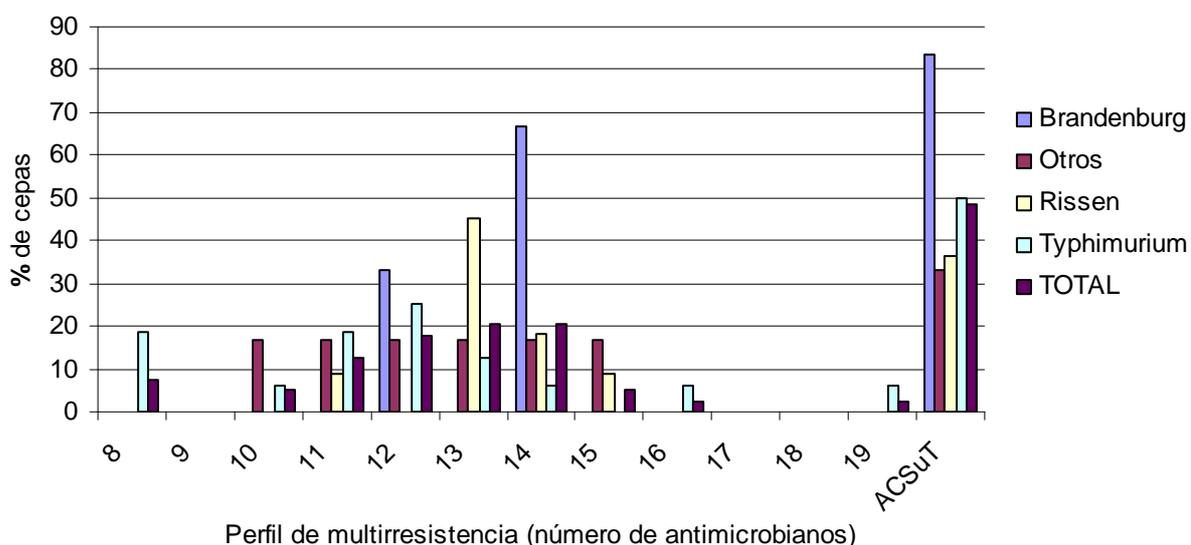


Figura 4.9. Porcentaje de cepas de cada serovar con resistencia a entre 8 y 19 antimicrobianos y que presentan el perfil de pentarresistencia dentro de la subcolección de aislados multirresistentes de cerdo blanco.

Analizando en detalle la distribución de fagotipos, clones y especies de origen de cada uno de los aislados que presentan pentarresistencia se observa que apenas 9 casos no provienen del cerdo (blanco o ibérico) y en cualquier caso se trata de aves cuyo aislado resultó de un serovar y fagotipo (en algún caso incluso pulsotipo) también asociado al ganado porcino (Tabla 4.6.).

Tabla 4.6. Cepas con el perfil de pentarresistencia AMP-CHL-STR-SUL-TET. Entre paréntesis cuando se dio más de un aislado de ese hospedador.

Serovariedad	Fagotipos	Pulsotipos	Hospedador
Typhimurium	104	TY43	Canario
		TY47	Canario
	104b	TY34	Codorniz, Perdiz
		TY09	Porcino blanco (6)
	204a	TY15	Perdiz
		TY48	Perdiz
	U302	TY43	Perdiz
		TY13	Porcino blanco (3)
		TY48	Perdiz
		TY03	Porcino ibérico
	193	TY11	Porcino ibérico (4)
		TY13	Porcino ibérico
		TY26	Porcino ibérico
		TY67	Porcino ibérico
	29	TY48	Porcino
		TY53	Porcino ibérico
	NT	TY58	Porcino ibérico
		TY77	Porcino ibérico
	U310	TY64	Porcino ibérico
	203	TY13	Porcino ibérico
4,5,12:i:-	193	MO3	Perdiz
	U302	MO2	Porcino blanco
Brandenburg		BA1	Porcino blanco
		BA2	Porcino blanco (4)
Bredeney		BE8	Porcino blanco
Rissen		RI1	Porcino blanco (4)
Hindmarsh		HI1	Porcino ibérico (5)

Aunque el sistema de explotación está muy relacionado con la generación de resistencia a los antimicrobianos (Angulo et al. 2004), no se encuentra en él la única respuesta a cómo éstas se generan, como ya se vio en el punto anterior. Si se relacionan el nivel de intensificación (0-3) con la multirresistencia (0-20 antimicrobianos) obtenemos una Correlación de Pearson negativa -0,280 (P=0,000), es decir, no se cumple lo previsible: que sería a mayor intensificación mayor multirresistencia. Sin embargo para los grados de intensificación 0 y 1, sí que observamos una media mayor en cuanto a su multirresistencia para el grupo cepas aisladas principalmente de casos clínicos (7,90) respecto a las procedentes de cerdos ibéricos cebados en montanera (5,29). La dispar distribución de los serotipos entre estos grupos parece ser, de nuevo, la causa de esta paradoja, excepto para los grupos donde hay cierto equilibrio como sería el caso de los grados 0 y 1 como se puede observar en la tabla 5.2.

Si comparamos entre serovariedades las medias de resistencia frente a los antimicrobianos a los que muestra resistencia cada grupo de intensificación se obtienen resultados estadísticamente significativos entre los aislados de *S. Typhimurium* con una media de $11,29 \pm 5,02$ antibiorresistencias (AMR) para el grupo 0 frente a $7,52 \pm 2,47$ para las cepas procedentes de cerdo ibérico en montanera. En *S. 4,5,12:i:-* se repite la misma situación que ya comentamos en el punto 4.2.3. Es decir, son más resistentes las cepas aisladas de cerdos ibéricos con acabado en cebo+recebo que las de montanera: $8,14 \pm 0,9$ frente a $5,63 \pm 0,5$ AMR.

4.2.5. Identificación y análisis de expresión de beta-lactamasas.

a. Determinación cualitativa de la actividad enzimática.

Todas las cepas resistentes frente a una cefalosporina al menos fueron sometidas al test de actividad beta-lactamasa en placa. De las 50 cepas, 21 no mostraron ninguna actividad, 5 una actividad baja, 11 media y 13 alta (Tabla 4.7). Destaca *S. Typhimurium* DT104b que presenta un 50% de cepas con alta actividad beta-lactamasa. Las once cepas con actividad baja, media y alta de este fagotipo se corresponden a un solo clon (TY09) aislado en todos los casos de cerdo blanco. Del mismo serovar pero fagotipo 193, hay otras dos cepas procedentes de cerdo ibérico que serían las únicas no aisladas de porcino blanco con actividad beta-lactamasa. De perdiz roja proceden los otros dos casos de *S. Typhimurium* DT193 más otras dos cepas (actividades baja y media) fagotipadas como DT204a. De manera que por especies de origen un 57% de los aislados de perdiz roja presentaron algún tipo de actividad; 6 de cerdo ibérico (5,8% de los aislados) y por último 18 casos del blanco (42,9%) (Tabla 4.7 y anexos).

b. Identificación de genes para beta-lactamasas.

Todas las cepas que mostraron actividad beta-lactamasa en el test cualitativo, además de todas las resistentes a alguna de las cefalosporinas, fueron sometidas a un *screening* para los genes de las principales beta-lactamasa descritas en *Salmonella* spp, que son: *bla*TEM, *bla*OXA, *bla*CMY, *bla*SHV y *bla*CTX-M. Tan sólo se detectaron los determinantes génicos para las enzimas TEM y OXA, en ningún caso de modo simultáneo y siempre en aquellos aislados que previamente habían mostrado actividad en placa (Figura 4.10). Para cerciorarnos

de que ninguno de estos extractos acelulares presentase otra beta-lactamasa aparte de las incluidas en el screening se realizó su resolución mediante isoelectroenfoque (IEF), que terminó por confirmar este extremo: una única enzima con el pI esperado es en todos los casos la responsable de la actividad beta-lactamasa.

Tabla 4.7. Caracterización cualitativa de la actividad beta-lactamasa. Se indican las cepas y entre paréntesis el porcentaje respecto al total de aislados del mismo serovar/fagotipo.

Serotipo	Fagotipo	Ninguna	Baja	Media	Alta	
Enteritidis	33	C30 (100)				
	4	SAV06 (100)				
	1	SAV05 (14,3)				
	7	SAV02 (100)				
	NT	SAV04 (100)				
Agona		MB3 (100)				
Choleraesuis		C58 (16,7)	MP19 (16,7)	MP41 (16,7)		
Montevideo		MP11 (20)				
Derby		MP14 (10)				
Rissen		P31, P33, P34, P63, P65 (33,3)		P64 (6,7)	P48 (6,7)	
Hadar	2	P18, SAV07 (66,7)				
Essen		MP15 (33,3)				
Goldcoast		P47 (100)				
Bredeney					P06 (14,3)	
Brandenburg				P10 (16,7)		
Anatum				P51 (7,1)		
Typhimurium & 4,5,12:i:-	104b		P03 (7,1)	P09, P26, P29 (21,4)	P21, P22, P23, P25, P27, P30, P50 (50)	
	15a	C46 (100)				
	193	MP21 (3,4)	C48, C54 (6,9)		CP51, CP67 (6,9)	
	204a		C56 (50)	C38 (50)		
	208	MP13 (100)				
	29			P57 (100)		
	U311				P13 (9,1)	
	NT			C66, MP41 (25)	P24 (12,5)	
	TOTAL		21	5	11	13

c. Determinación cuantitativa de la actividad beta-lactamasa

Para todas las cepas que presentaron actividad beta-lactamasa detectable mediante el

ensayo cualitativo se calculó su actividad enzimática específica utilizando de nuevo el nitrocefín como sustrato, en presencia o ausencia del inhibidor clavulanato (Figura 4.10). La expresión de actividad beta-lactamasa fue significativamente mayor en las cepas con el determinante TEM. La media de actividad de las cepas con la enzima TEM fue de $319,7 \pm 117,8$ mU/mg mientras que para OXA fue de $162,9 \pm 38,1$ mU/mg en ambos casos con una significación de 0,002 (Prueba de Levene para la igualdad de varianzas). También se observa que la actividad en las cepas positivas para TEM presentó un mayor grado de inhibición con clavulanato que las cepas positivas para OXA, lo que se confirma estadísticamente al hacer la comparación de medianas con los datos de CMI del combinado de dicho compuesto junto con la amoxicilina (Chi-cuadrado=16,931, P=0,000, para la variable de agrupación OXA).

Además se observa una asociación de los determinantes génicos con la resistencia frente a antimicrobianos concretos. Así, la resistencia de las cepas que presentan el determinante OXA frente a cefotaxima (Chi-cuadrado=11,081, P=0,001) y cefquinoma (Chi-cuadrado=24,836, P=0,000) fue significativamente superior al resto. En general e independientemente del tipo de enzima se detecta una asociación entre el nivel de actividad beta-lactamasa y el aumento de la CMI para la cefalotina (Correlación de pearson 0,506, P=0,005) y la cefquinoma (0,508; P=0,005), mientras que para las otras tres cefalosporinas los valores obtenidos no son estadísticamente significativos.

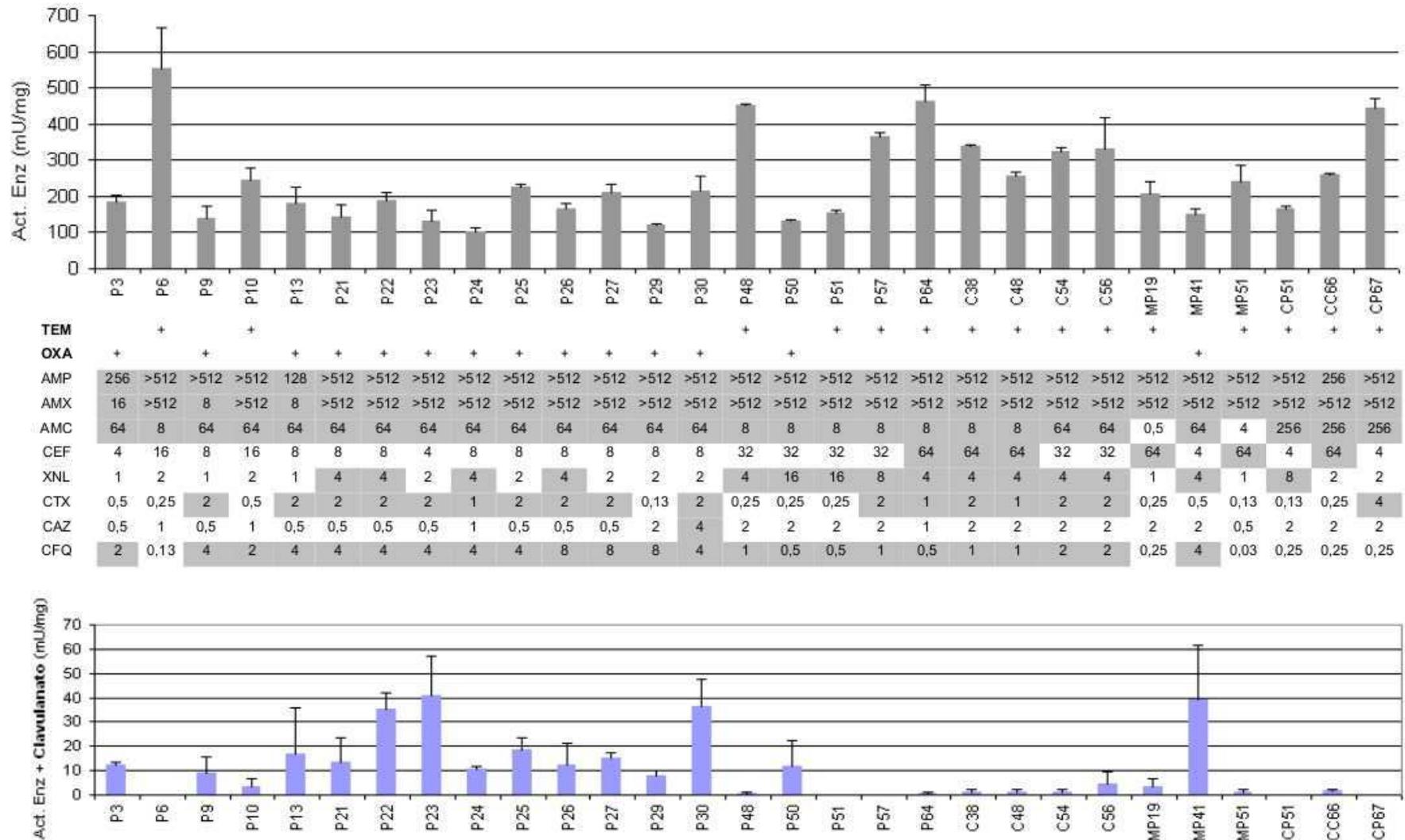


Figura 4.10. Actividad beta-lactamasa (mU/mg proteína) de las cepas resistentes a cefalosporinas y positivas al test cualitativo. Las actividades enzimáticas se determinaron en ausencia (barras grises) y en presencia (barras azules) de clavulanato. En la tabla se indican las positivas en PCR e IEF a TEM u OXA así como los valores de CMI (mg/L) para cada antimicrobiano beta-lactámico testado. Los valores de resistencia han sido resaltados en gris.

Por otro lado, la resistencia de las cepas que expresan el determinante TEM parece ser mayor frente a cefalotina (Chi-cuadrado=16,044; P=0,000), ceftiofur (Chi-cuadrado=6,349; P=0,012) y ceftazidima (Chi-cuadrado=6,349; P=0,012). La prueba de Kruskal-Wallis es igual de concluyente (Tabla 4.8). Llama la atención también al hacer este análisis el menor efecto que aparentemente tiene la presencia de OXA sobre la amoxicilina (Tabla 4.9), con una diferencia de CMI en función de la expresión o no de dicha enzima no estadísticamente significativa (P=0,186).

Tabla 4.8. Rangos para valores de CMI con variable de agrupación TEM. Debajo sus estadísticos de contraste.

Antimicrobiano	<i>bla</i> TEM	N	Rango promedio
Ampicilina	,00	35	21,71
	1,00	15	34,33
Amoxicilina	,00	35	22,07
	1,00	15	33,50
Amoxi_Clavulánico	,00	35	23,76
	1,00	15	29,57
Cefalotina	,00	35	20,56
	1,00	15	37,03
Ceftiofur	,00	35	22,11
	1,00	15	33,40
Cefotaxima	,00	35	24,06
	1,00	15	28,87
Ceftazidima	,00	35	23,34
	1,00	15	30,53
Cefquinoma	,00	35	27,77
	1,00	15	20,20

Estadísticos de contraste (a,b)

	AMP	AMX	AMC	CEF	XNL	CTX	CAZ	CFQ
Chi-cuadrado	10,076	9,469	1,793	13,907	6,772	1,199	2,779	2,897
gl	1	1	1	1	1	1	1	1
Sig. asintót.	,002	,002	,181	,000	,009	,274	,096	,089

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: *bla*TEM

Tabla 4.9. Rangos para valores de CMI con variable de agrupación OXA. Abajo sus estadísticos de contraste.

Antimicrobiano	blaOXA	N	Rango promedio
Ampicilina	,00	36	22,64
	1,00	14	32,86
Amoxicilina	,00	36	24,10
	1,00	14	29,11
Amoxi_Clavulánico	,00	36	21,14
	1,00	14	36,71
Cefalotina	,00	36	26,00
	1,00	14	24,21
Ceftiofur	,00	36	24,90
	1,00	14	27,04
Cefotaxima	,00	36	21,53
	1,00	14	35,71
Ceftazidima	,00	36	27,31
	1,00	14	20,86
Cefquinoma	,00	36	19,08
	1,00	14	42,00

Estadísticos de contraste (a,b)

	AMP	AMX	AMC	CEF	XNL	CTX	CAZ	CFQ
Chi-cuadrado	6,343	1,747	12,373	,157	,232	10,015	2,146	25,474
gl	1	1	1	1	1	1	1	1
Sig. asintót.	,012	,186	,000	,692	,630	,002	,143	,000

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: blaOXA

4.3. Genotipo de resistencia.

Uno de los objetivos principales de este trabajo es encontrar relaciones entre determinantes y fenotipos de resistencia. Ya se ha analizado la presencia de algunos determinantes de resistencia (beta-lactamasas) en el punto anterior, y ahora se profundizará en la identificación de otros genes en la colección de cepas de *Salmonella*, y se analizará su posible papel en la resistencia frente a los antimicrobianos.

4.3.1. Integrones

a. *int1* e *int2*

La presencia de integrones se escrutó utilizando PCRs específicas para los elementos *int1* e *int2* (ver *Material y métodos*). No se ha detectado en nuestro cepario ningún integrón de tipo 2. Sin embargo un 38,4% del cepario presenta integrones de tipo 1 (un total de 78). La mayor parte de los integrones se han localizado en cepas del serotipo Typhimurium (n=25, 56,8% de los integrones, sin contar los detectados en cerdo blanco), seguidos de su variante monofásica (n=4, 9,1%) y Hindmarsh (n=5, 11,4%). El resto de serovariedades tan sólo tienen 1 integrón cada una, excepto Derby con dos (Figura 4.10.).

Entre las cepas aisladas de cerdo blanco destaca *S. Typhimurium* con 18 integrones (50% del total de integrones de la subcolección y 100% de los aislados de dicho serotipo), seguido de *S. Brandenburg* (también 100% de cepas, es decir 6 integrones), *S. Bredeney* (100%, 2 integrones), *S. Anatum* (100%, 1 integrón), *S. 4,5,12:i:-* (100%, 1 integrón) y por último *S. Rissen* con 8 integrones (72,7% de las cepas positivas).

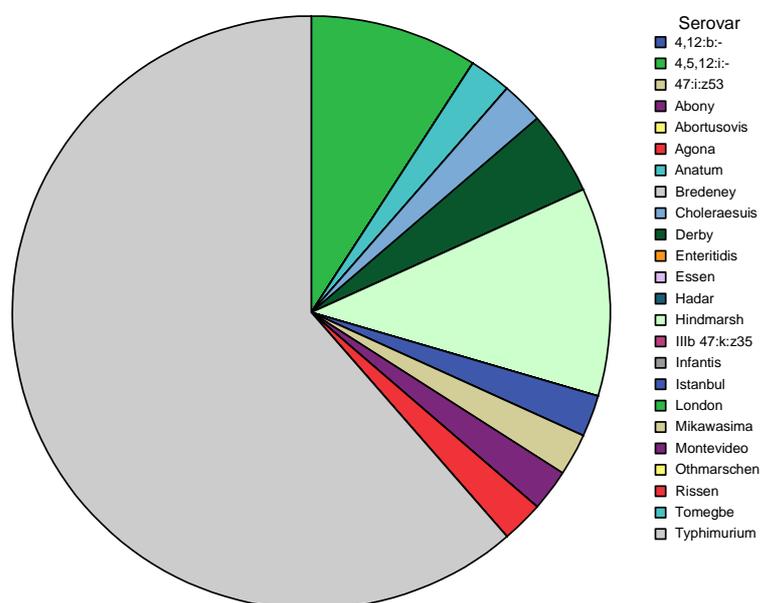


Figura 4.11. Distribución de los integrones detectados en serovares aislados de las diversas especies animales excepto del cerdo blanco.

Hay una relación estadísticamente significativa con el ganado porcino ibérico (Chi=25,182; P=0,031), con el cerdo blanco (Chi=24,182; P=0,002) y con las cepas de origen avícola (Chi=26,000; P=0,000) aunque en este último caso se trate de la ausencia de integrones. De hecho, tan sólo una cepa *int1* positiva procedía de avicultura y se trataba de una *S. Typhimurium*. Del resto de especies, los aislados positivos también resultaron ser *Typhimurium* (2 de canario, 1 de codorniz, 1 de caballo, 6 de perdiz) o su variante monofásica (1 aislado de perdiz) (ver tablas en anexos).

Hay una fuerte correlación entre el número de antimicrobianos a los que muestra resistencia la cepa y que dicha cepa contenga el integrón de tipo 1 (Correlación de Pearson=0,669; P=0,000). Un 93,6% de los integrones han sido detectados en cepas multirresistentes. Un 79,5% de las cepas con resistencia a entre 8 y 14 antimicrobianos tenían este determinante de resistencia (Figura 4.12).

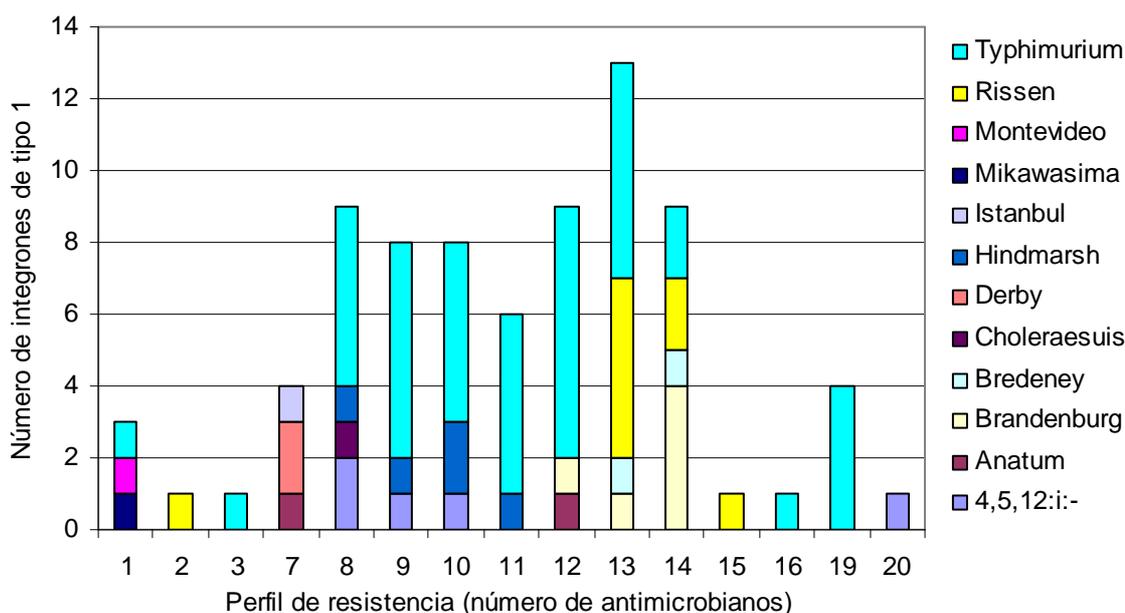


Figura 4.12. Expresión de la multirresistencia en función del serovar entre cepas portadoras de *int1*.

La presencia del integrón de tipo 1 está correlacionada con la pentarresistencia (Pearson=0,643; P=0,000) y tan sólo en un 6,1% (n=3) de las cepas con perfil de resistencia AMP-CHL-STR-SUL-TET no se ha detectado el integrón. Por el contrario, con el integrón

pero sin el perfil de pentarresistencia se detectan 32 cepas (41%).

b. Casetes

Se analizó la presencia de casetes génicos asociados a integrotes de tipo 1 (ver *Material y métodos*; figuras 4.12 y 4.13). Se amplificaron 8 casetes, o combinaciones de las mismas, con tamaños de entre 2 y 0,8 kilobases (kb) (Figura 4.13). La combinación de los casetes y los perfiles de RFLP nos llevaron a clasificar todas las cepas positivas en diez patrones, de la A a la J, si bien las bandas del patrón F son iguales a la suma de los patrones G y H, y lo mismo sucede con el patrón I respecto a C y D. La secuenciación de las casete/s asociada/s a cada uno de los patrones permitió determinar (mediante comparaciones realizadas con el programa BLAST; Altschul et al. 1990) los genes contenidos en cada elemento (Tabla 4.10). Además de *bla*OXA-30 se detecta *bla*PSE1, que codifica una betalactamasa con actividad sobre penicilinas pero no cefalosporinas (penicilinas; Bush et al. 1995a); *aadA1*, *aadA2* y *aadA12*, que codifican adeniltransferasa resistencia a estreptomicina y espectinomicina); y *dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA17* y *dhfrVII*, que codifican DHFR que confieren resistencia al trimetoprim. Por otro lado, no se amplificó ninguna casete en 24 cepas positivas a *int1* (30,8%).

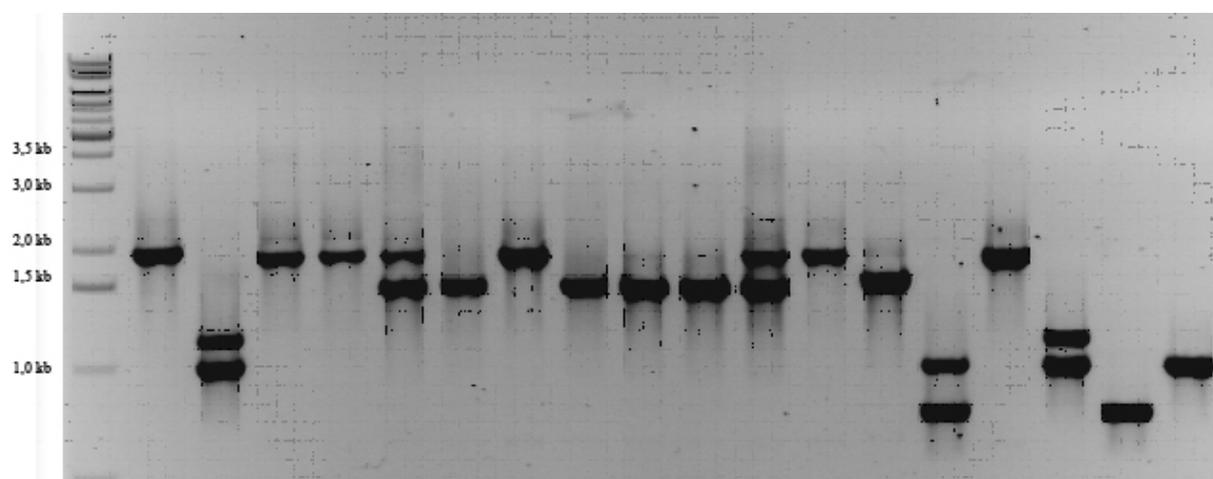


Figura 4.13. Amplificación de casetes génicas asociadas a *int1*. De izquierda a derecha casetes de los patrones: A, B, I, D, F, G y H.

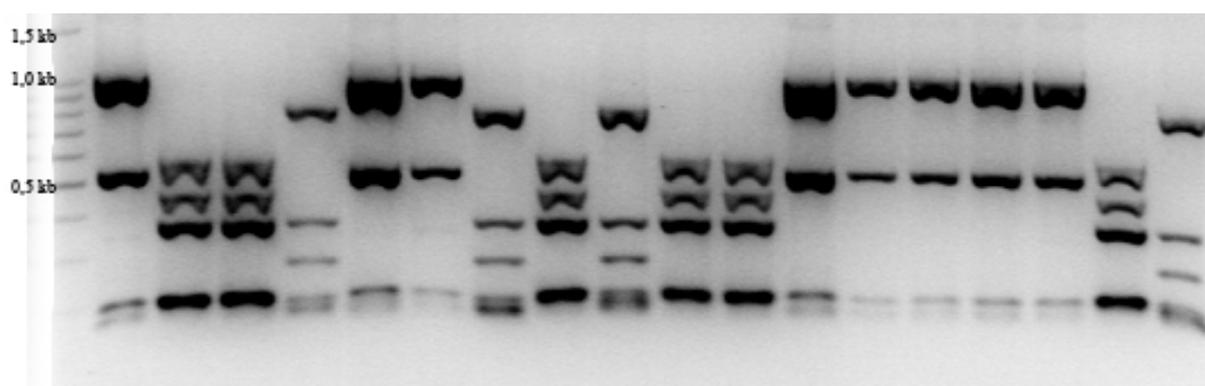


Figura 4.14. Análisis mediante RFLP de las casetes génicas. De izquierda a derecha fragmentos de los patrones A, B, B y C con distinta frecuencia de presentación.

Tabla 4.10. Casetes génicos asociados a *int1* identificados en las cepas de *Salmonella* de la colección. Se muestran los perfiles de RFLP, tamaño de las casetes, los genes asociados a cada patrón así como su frecuencia respecto al total de cepas positivas para *int1*. Los superíndices indican los amplicones de RFLP que corresponden a cada amplicón de CS.

Patrón	CS (kb)	RFLP con <i>HaeIII</i> (kb)	Genes secuenciados	N	%
A	2.0	1.00, 0.40, 0.20, 0.18	blaOXA-30	14	17,9
B	1.0 ¹ & 1.2 ²	0.58 ² , 0.45 ² , 0.35 ¹ , 0.2 ¹	aadA2 ¹ and bla-PSE1 ²	6	7,7
C	1.9	0.82, 0.38, 0.30, 0.18	dfrA12 and aadA2	8	10,3
D	1.6	0.50, 0.35, 0.25, 0.20	dfrA1 and aadA1	13	16,7
E	1.7	1.10, 0.25, 0.18	aadA5, dfrA17	2	2,3
F (G+H)	0.8 ⁴ & 1.0 ³	0.60 ⁴ , 0.50 ³ , 0.20 ^{3,4}	aadA1 ³ and dhfrVII ⁴	3	3,8
G	0.8	0.60, 0.20	dhfrVII	2	2,3
H	1.0	0.50, 0.20	aadA1	1	1,3
I (C+D)	1.9 ⁶ & 1.6 ⁵	0.82 ⁶ , 0.50 ⁵ , 0.38 ⁶ , 0.35 ⁵ , 0.30 ⁶ , 0.25 ⁵ , 0.20 ⁵ , 0.18 ⁶	dfrA1 ⁵ and dfrA12 ⁶	3	3,8
J	0.9	0.40 & 0.21	aadA2	2	2,3
SUBTOTAL (<i>int1</i> positivas)				54	69,2

*Los superíndices relacionan los fragmentos de RFLP que corresponden a cada gen y amplicón en los patrones de casetes combinadas.

Todos los perfiles de restricción excepto E y J están asociados a la pentarresistencia ($\chi^2=72,129$; $P=0,000$). Tan sólo no se amplificaron casetes en 16 cepas que presentan el perfil ACSSuT (cuando se comparó con *int1* tan sólo se detectaron tres casos negativos). Por otro lado, hasta 21 cepas con perfil de restricción asignado no mostraron la pentarresistencia en el análisis fenotípico. Los perfiles F y H (100%), seguidos por B (83,3%), D (76,9%), C (62,5%), A y G (50%) y por último I (33,3%) presentaban la asociación citada (A, B, C y D

de manera estadísticamente significativa).

Tabla 4.11. Distribución de la pentarresistencia según el genotipo definido por las casetes génicas asociadas a *int1*.

Perfil	Pentarresistencia		Total
	Ausente	Presente	
∅	133	16	149
A	7	7	14
B	1	5	6
C	3	5	8
D	3	10	13
E	2	0	2
F	0	3	3
G	1	1	2
H	0	1	1
I	2	1	3
J	2	0	2
TOTAL	154	49	203

Las dos cepas con perfil de restricción J están muy próximas filogenéticamente y pueden corresponder a un clon de *S. Derby*. Su perfil de resistencia, STR-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TET, no incluye a ningún beta-lactámico. En el caso del perfil E, se detectan dos fenotipos más divergentes: AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SUL-SXT-TMP-TET-XNL (cepa P06) y AMP-AMX-AMC-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL (cepa P51). En cuanto a la divergencia detectada para los aminoglicósidos, ambas presentan resistencia límite para ser consideradas cepas sensibles. Sin embargo, frente al cloranfenicol la cepa P51 presenta una CMI cinco veces mayor que el aislado P06, por lo que probablemente la resistencia a dicho antimicrobiano no está relacionada con la presencia del integrón.

Si se consideran únicamente los antimicrobianos cuya resistencia está asociada a los integrones de tipo 1 y/o la SGI1 (AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TMP-TET; Tabla 4.12), se detecta una fuerte relación entre el perfil de antibiorresistencia AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TET y la presencia del patrón B (5/6), así como entre el perfil AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET y el patrón F (3/3). Apenas hay resistencia a florfenicol fuera de estas cepas (n=3, en ningún caso con *int1*) y la cepa con el perfil de CS pero sin resistencia fenotípica a los fenicoles presenta una CMI

inmediatamente inferior al punto de corte considerado para el cloranfenicol (CMI=16mg/L) y no mucho menor para el florfenicol (CMI=8mg/L), luego puede considerarse moderadamente resistente. A pesar de haber encontrado un perfil de integrón que codifica resistencia para estreptomicina y espectinomicina en las cepas MP49 y SAV12 (perfil D), ninguno de estos dos microorganismos muestran resistencia fenotípica, aunque en el primer caso los datos de CMI están justo en el límite de la resistencia. Por otro lado, estas cepas presentan resistencia a otro aminoglicósido: la kanamicina.

La cepa SAV12, aislada de avicultura intensiva, muestra una CMI algo inferior para la estreptomicina (16 mg/L) y está en el límite para la espectinomicina (256 mg/L), aunque sí presenta resistencia a la gentamicina, la neomicina y la kanamicina. El único caso en el que no podemos explicar esta falta de complementariedad entre perfiles de integrón y de resistencia sería para la cepa MP01. Lo contrario, es decir un perfil de resistencia no contenido en los determinantes localizados en las casetes de los integrones es mucho más habitual sobre todo para los antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol, cloranfenicol y beta-lactámicos excepto para los perfiles A y B. Todo ello parece indicar la asociación de dichos integrones a otros determinantes de resistencia como podría ser la SG11. Más adelante en este trabajo, cuando se analicen otros determinantes de resistencia, se profundizará en ello. Por lo demás, la gran heterogeneidad en los perfiles de resistencia se debe a cambios puntuales de algún antimicrobiano (Tabla 4.12).

S. Typhimurium es el serotipo más heterogéneo en cuanto al número de perfiles de restricción distintos detectados: A, B, D, F y G. De hecho, es el único serotipo con tantos perfiles distintos, aunque también presentan cierta variedad *S. 4,5,12:i:-*; *S. Rissen*; *S. Anatum*; *S. Brandenburg* y *S. Bredeney*. Parte de esta elevada frecuencia es achacable a la contribución de los aislados procedentes de porcino blanco, que son siete en total, tres de ellos *S. Typhimurium*, lo que da una asociación estadísticamente significativa, con $\text{Chi}=25,667$ y $P=0,001$. En menor medida también contribuyen los aislados procedentes de cerdo ibérico, estrechamente asociados a los perfiles A, D, G, J; presentando $\text{Chi}=29,967$ y $P=0,000$. Por último, otras especies como la perdiz roja contribuyen significativamente a esta diversidad, probablemente mediante la dispersión de *S. Typhimurium* (perfiles B, F y G, aparte de H con su variante monofásica 4,5,12:i:-).

Tabla 4.12. Distribución de los casetes genicos asociados a *int1* entre fenotipos, genotipos y origen de los aislados.

CS	Antibiorresistencia	Serovar	Fago/pulsotipo	Especies
A	AMC-CHL-SUL-SXT-TMP	Typhimurium	DTU311 (TY09)	PB (P13)
	AMP-AMX-AMC-SPT-CHL-SXT-TET			PB (P03)
	AMP-AMX-AMC-SPT-CHL-SUL-SXT-TET		DT104b (TY09)	PB (P29, P30)
	AMP-AMX-AMC-SPT-CHL-SUL-TET			PB (p24, P26)
	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TMP-TET		DT104b (TY16)	PB (P50)
	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-TET		DT104b (TY09)	PB (P21, P22, P23, P25, P27)
	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TET		NT (TY48)	PI (MP41),
		DT104b (TY09)	PB (P09)	
B	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TET	Typhimurium	DT104b (TY34, TY43, TY47)	Codorniz (C06), perdiz (C07), canario (C03, C04)
	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TET		DTU302 (TY43)	Perdiz (C19)
C	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	4,5,12:i:-	DTU302 (MO2)	PB (P11)
	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TMP-TET	Rissen	R11	PB (P12)
D	AMP-AMX-AMC-SUL-SXT-TMP	Anatum	AN6	PB (P32, P33, P34, P63)
	*AMP-AMX-AMC-STR-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	Hindmarsh	HI1	PB (P49, P64, P65)
	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	Brandenburg	BA2	PI (MP49)
		Bredeney	BE8	PI (MP42, MP43, MP45, MP46, MP47)
E	STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	Choleraesuis	NT	PB (P35, P36, P38, P39)
	AMP-AMX-AMC-SUL-SXT-TMP-TET	Typhimurium	NT (TY66)	PB (P07)
	AMP-AMX-AMC-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	Anatum	AN1	PI (MP34)
F	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TMP-TET	Bredeney	BE5	Avicultura (SAV12)
	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	Typhimurium	DT 29, DT193, DT204a (TY48).	PB (P51)
G	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	Typhimurium	DT204a (TY15)	PB (P57) y perdiz (C54, C56)
	GEN**	Montevideo	MN1	Perdiz (C38)
H	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	4,5,12:i:-	DT193 (MO3)	PI (MP01)
	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	Brandenburg	BA1	PI (MP01)
I	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SXT-TMP-TET	Rissen	RI1	Perdiz (C48)
	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TET			PB (P10)
J	STR-SPT-SUL-SXT-TET	Derby	DE3	PB (P05)
			DE4	PB (P48)
Ø	STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	4,5,12:i:-	193 (MO1)	PI (CP23)
	STR-TET	Istanbul	IS1	PI (MP22, MP23, MP24)
	SXT	Mikawasima	MI1	PI (MP31)
	TET	Rissen	RI1	PI (MP18)
Ø			193 (TY03)	PI (MP20)
			193 (TY11)	PI (CP64)
	*AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET		U302 (TY13)	PI (CP02, CP03, CP04, CP05)
			193 (TY13)	PB (P19, C49***, C50), equino (C51***)
			193 (TY13)	PI (CP61)
		Typhimurium	193 (TY25 & TY26)	PI (CP66***, CP01)
			193 (TY67)	PI (CP67)
	*AMP-AMX-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET		193 & 203 (TY13)	PI (MP36, CC63)
	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TMP-TET		193 (TY13)	PI (MP50)
	AMC-TMP		NT (TY05)	PI (CP06)
NEO		204c (TY78)	Perdiz (C29)	

*Perfil que contiene la pentarresistencia. ** PI: porcino ibérico. PB: porcino blanco.

***Sin SPT o CHL en su antibiograma pero en el límite del valor WT.

En cuanto a **fagotipos** es digna de mención la abundancia muy significativa de *S. Typhimurium* DT 104b, con 11 integrones de perfil A y 3 del perfil B. Otros fagotipos, también de la serovariedad *Typhimurium*, como U302 (perfiles B y C), 204a (F y G) o 193 (F y H) están más escasamente representados (un caso por perfil). *S. Typhimurium* DT193 presenta una peculiaridad y es ser el fagotipo con mayor frecuencia de negativos para la amplificación de casetes asociadas a *int1* (n=14, un 87,5% sobre el total de sus *int1* positivos). De hecho, el 58,3% de las casetes que no han podido ser amplificadas corresponden a este fagotipo (Tabla 4.12), procediendo la mayoría de cerdo ibérico. Las dos únicas cepas DT193 en las que no ocurrió esto proceden de casos clínicos de perdiz roja (C48 y C54), en las que se detectaron los perfiles H y F.

c. Asociaciones entre *int1* y los determinantes de resistencia frente a cefalosporinas.

En el apartado 4.2.5 se vió que únicamente se podían amplificar los genes *bla*TEM y *bla*OXA entre los posibles genes para beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) descritos en *Salmonella*, que incluyen también *bla*SHV, *bla*CTX-M y *bla*CMY. En total se detectaron 29 aislados conteniendo genes BLEEs, que explicarían la resistencia a las cefalosporinas en un 58% de los casos. El resto de las cepas no mostraron actividad beta-lactamasa en placa ni fueron positivas al *screening* genotípico. En total hemos secuenciado 19 *bla*TEM y 14 genes *bla*OXA. Cuatro genes del primer tipo a partir de cepas sin resistencia a cefalosporinas que sin embargo nos van a servir para analizar la asociación de ambos genes con los perfiles de los integrones de tipo 1. Las secuencias de todos los fragmentos amplificados correspondieron a los mismos alelos: TEM-1 y OXA-1 (u OXA-30) respectivamente.

Si comparamos la presencia de estos determinantes con cepas positivas a *int1* vemos que existe una fuerte asociación en ambos casos, sobre todo para *bla*OXA, aunque esto es lo lógico ya que la casete A lo contiene integrado en su estructura. Por otro lado, además de este gen, un 84,2% de las cepas *bla*TEM positivas lo son a la vez para la integrasa de tipo 1 ($\chi^2=6,071$; $P=0,014$). Además el gen *bla*TEM está asociado ($\chi^2=38,433$; $P=0,000$) a todos los perfiles excepto C, dónde tan sólo hay un positivo entre cinco cepas analizadas (Tabla 4.13). Se trata de la única cepa no serotipada como Rissen de dicho grupo: P12, *S.* 4,5,12:i:- DT

U302. No se ha intentado amplificar ningún gen *bla* en cepas con perfil B ni J, si bien estas últimas no han mostrado resistencia a ninguna cefalosporina.

Tabla 4.13. Número de cepas positivas o negativas a la PCR de *bla*TEM en función de los tipos de perfil de los integrones de tipo 1.

Perfil	<i>bla</i> TEM		Total
	-	+	
Ø	17	3	20
A	13	0	13
C	4	1	5
D	0	6	6
E	0	2	2
F	0	3	3
G	0	1	1
H	0	1	1
I	0	2	2
TOTAL	34	19	53

4.3.2. Determinantes de resistencia a quinolonas.

En 26 de las 37 cepas resistentes a una quinolona al menos se han detectado determinantes de resistencia, aunque tan solo en las QRDR de *gyrA* y *parC* (tabla 4.14), pero no en *gyrB* ni *parE*, como tampoco se han detectado cepas positivas a las PCR para genes PMQR, que son *qnr*, *qepA* o *aac(6')-Ib-cr*.

En la mayoría de las cepas que expresan la resistencia pero no presentan determinantes conocidos (Tabla 4.14), el valor de CMI apenas sobrepasa el límite de corte excepto en aislados procedentes de casos clínicos: como C19 (CMI_{NAL}=128 mg/L), C46 (CMI_{ENR}=0,5 mg/L, CMI_{CIP}=0,25 mg/L), C49 (CMI_{NAL}=256 mg/L, CMI_{ENR}=0,5 mg/L), C36 (CMI_{CIP}=0,25 mg/L) y C11 (CMI_{NAL} =128 mg/L). Las demás también procedían de casos clínicos, como C58 (*S. Choleraesuis* CH3, procedente de jabalí), C51 (*S. Typhimurium* U302/DT13, de equino), y de muestras de matadero como MP17 (*S. Mikawasima* MI1, de cerdo ibérico), P25 y P21 (*S. Typhimurium* DT104b/TY09, de cerdo blanco) y P19 (*S. Typhimurium* U302/TY13, de cerdo blanco).

Tabla 4.14. Determinantes de resistencia a quinolonas en los aislados de *Salmonella enterica* ensayada

Resistencia	Determinante	Serovar	Fago y pulsotipo	Hospedador	Cepas
NAL-ENR-CIP	S83Y	4,5,12:i:-	193 (MO2)	Perdiz	C48
		Typhimurium	204b (TY15); 29, 193, 204a (TY48),	Perdiz, cerdo blanco	C38, P57, C54, C56
	D87Y	Enteritidis	7, 1, PNR (EN02)	Avicultura	SAV02, SAV05, SAV11, SAV17
		Essen	ES01	Cerdo ibérico	MP15, MP16
	S83F	Enteritidis	1 (EN02)	Cigüeña	FVC4
	D87N, T57S	Hadar	2, 15, 1 (HA1)	Cerdo blanco	P18, SAV07, SAV09, SAV10, SAV13
			Istanbul	IS1	Cerdo ibérico
		T57S	Typhimurium	NT (TY66)	Avicultura
	0	Typhimurium	U302 TY43	Perdiz	C19
	NAL-ENR	0	Choleraesuis	CH3	Jabalí
NAL-CIP	0	Enteritidis	EN01	Jabalí	C11
		Typhimurium	104b TY09	Cerdo blanco	P21
	D87Y	Hadar	U302 TY13	Cerdo blanco	P19
			35 (EN02)	Avicultura	SAV18
	D87Y, T57S	15 (HA1)	Avicultura	SAV15	
	T57S	Infantis	IN1, IN3	Avicultura	SAV14, SAV16
Othomarschen		OT	Avicultura	SAV08	
NAL-ENR	0	Typhimurium	U302 (TY13)	Cerdo blanco	C49
ENR-CIP	0	Typhimurium	15 ^a (TY68)	Equino	C46
	T57S	Brandenburg	BA1	Cerdo blanco	P10
CIP	0	IIIb 47:k:z35	NT	Varano	C36
		Typhimurium	104b TY09	Cerdo blanco	P25
NAL	0	Mikawasima	MI1	Cerdo ibérico	MP17
		Typhimurium	U302	TY13	C51

Las mutaciones más habituales fueron las que implicaron la sustitución del ácido aspártico en la posición 87 por asparagina (D87N: n=8), la sustitución por tirosina en el mismo codon (D87Y: n=7), serina por tirosina en el codon 83 (S83Y: n=6) y por último un único caso de serina por fenilalanina (S83F). En la QRDR de *parC* encontramos un único tipo de mutación que supone la sustitución de la treonina por serina en el codon 57 (T57S). Del mismo modo secuenciamos una mutación en *gyrA* (S83Y) y ocho en *parC* (T57S) entre la veintena de cepas sensibles a todas las quinolonas elegidas de manera aleatoria. Todas las cepas que presentaron la variante alélica D87N de la QRDR de *gyrA* a su vez tenían la mutación de *parC*.

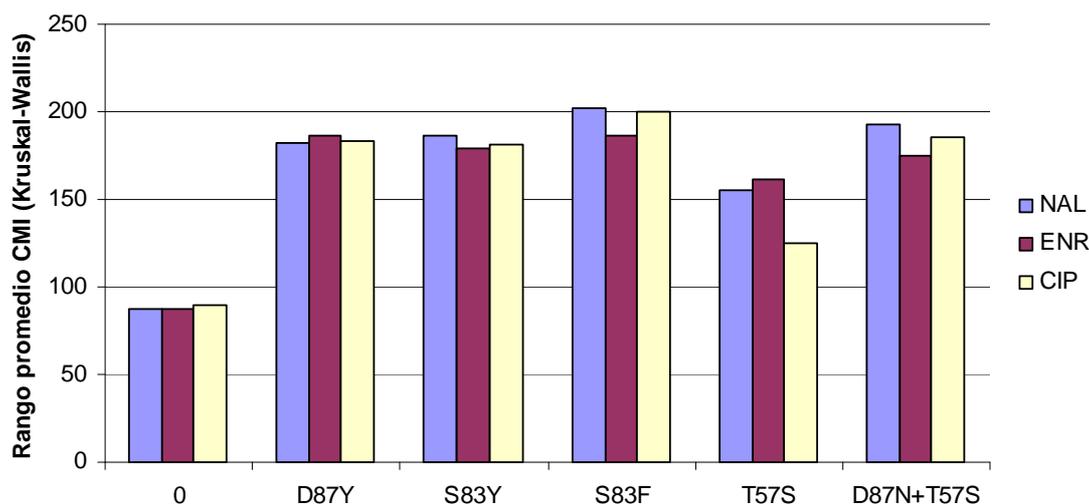


Figura 4.15. Rangos promedio de CMI para las distintas mutaciones de *gyrA* y *parC* según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

En general se observa que las mutaciones en las QRDR de *gyrA* y *parC* son responsables de una pérdida de sensibilidad a las quinolonas, si bien es cierto que no siempre en igual medida (Figura 4.12). Aunque no se detectan diferencias reseñables entre quinolonas -es decir las mutaciones afectan por igual a ácido nalidíxico, enrofloxacina y ciprofloxacina- no se puede decir lo mismo de la mutación T57S, que parece tener un efecto sensiblemente inferior sobre la resistencia especialmente para la ciprofloxacina, lo que se refleja en el hecho de que son más las cepas cuya CMI se situaría por debajo que por encima de la mediana cuando presentan dicha mutación (7 frente a 5, ver tabla 4.15). Sin embargo en términos generales las 20 cepas que presentaron dicha mutación tienen de media una CMI mayor que el resto incluso excluyendo las 8 que además presentaron el alelo de *gyrA* D87N (Tabla 4.16), aunque en este extremo no se trate de datos estadísticamente significativos.

Tabla 4.15. Prueba no paramétrica de la mediana para las cepas que presentaron los distintos genotipos de QRDR de *gyrA* y *parC*.

QN	N valores CMI	0	D87Y	S83Y	S83F	T57S	T57S+D87N
NAL	> Mediana	59	7	6	1	10	8
	<= Mediana	110	0	0	0	2	0
ENR	> Mediana	28	7	5	1	11	7
	<= Mediana	141	0	1	0	1	1
CIP	> Mediana	8	7	5	1	5	8
	<= Mediana	161	0	1	0	7	0

Tabla 4.16. Variabilidad de las medias de CMI (mg/L) para las distintas quinolonas por el efecto de la mutación T57S de *parC* (prueba T).

QN	<i>parC</i>	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
NAL	0	191	47,144	153,64995	11,11772
	T57S	12	70,3333	97,90843	28,26373
ENR	0	191	0,0836	0,15436	0,01117
	T57S	12	0,1142	0,05728	0,01654
CIP	0	191	0,0608	0,0927	0,00671
	T57S	12	0,0717	0,05149	0,01486

Las tres variantes alélicas de *gyrA* con más de un caso influyen de distinto modo en la CMI de las quinolonas. En general, la mutación S83Y supuso una mayor pérdida de sensibilidad tanto al ácido nalidíxico como a las fluoroquinolonas. De hecho, la CMI de las cepas con esta variante alélica fue el doble que para el resto de aislamientos con las otras dos mutaciones, excepto D87N para el ácido nalidíxico, que a su vez dobla los valores de los aislados con D87Y. Entre las cepas con estas dos variantes no se aprecian diferencias apreciables en su CMI respecto a las fluoroquinolonas (Tabla 4.17).

Tabla 4.17. Variabilidad de las medias de CMI (mg/L) para las distintas quinolonas por el efecto de las mutaciones en la QRDR de *gyrA* (prueba T).

QN	<i>gyrA</i>	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
NAL	D87Y	7	150,85	79,92	30,21
	S83Y	6	512,66	427,42	174,49
	D87N	8	336	152,03	53,75
ENR	D87Y	7	0,27	0,11	0,04
	S83Y	6	0,67	0,4	0,16
	D87N	8	0,29	0,15	0,05
CIP	D87Y	7	0,16	0,06	0,02
	S83Y	6	0,42	0,19	0,08
	D87N	8	0,18	0,06	0,02

Hay cierta asociación, aunque no es estadísticamente significativa, de las mutaciones a determinados serotipos, fagotipos y pulsotipos (Tabla 4.14.). Como era de esperar, la mayoría

de las mutaciones se detectan en la serovariedad Enteritidis (especialmente el pulsotipo EN02 asociado tanto a D87Y como al único caso de S83F), que es el que presenta mayores tasas de resistencia ya que un 35,7% de cepas de dicho serotipo presentaron algún determinante. La variante D87Y se encontró en dos cepas de *S. Essen* (aparentemente un mismo clon aislado dos veces de cerdo ibérico). Las seis cepas de *S. Brandenburg* presentaron la variante alélica T57S, pero tan sólo una presentó resistencia a alguna quinolona. En el pulsotipo de *S. Hadar* también se localizaron 6 genes *parC* con dicha mutación, pero en esta ocasión sí que mostraron resistencia a las tres quinolonas, aunque pudiera ser debida, como ya hemos comentado, a la mutación D87N (únicas cepas, junto a dos de *S. Istanbul*, que presentan doble mutación). En *S. Typhimurium* se ha detectado una mutación en *parC* y 5 en *gyrA* (todas S83Y, la otra cepa con dicha mutación es un caso de su variante monofásica). Los serotipos *Infantis* y *Othmarschen* también presentaron la mutación de *parC*.

5. Discusión.

5.1. Cepario

5.1.1. Serotipos

Aunque no es el objeto de este estudio, analizar la prevalencia de los serovares por especies de origen puede permitir rastrear la procedencia de las resistencias y su trascendencia para la salud pública.

Las frecuencias de presentación de las distintas serovariedades no se corresponden con las más habitualmente aisladas en el hombre puesto que predomina el serotipo Typhimurium (31%, n=63) sobre Enteritidis (6,9%, n=14), consecuencia del mayor número de aislados de origen porcino (n=136) frente a las 37 cepas procedentes de avicultura. Aunque la mayoría de las infecciones en el hombre se deben a productos de origen avícola (serotipo Enteritidis), los productos de origen porcino (*S. Typhimurium*) están aumentando su importancia como causa de la toxiinfección alimentaria, fruto posiblemente de las medidas higiénico-sanitarias y los planes de control iniciados sobre 1990 y que se han centrado precisamente en las producciones avícolas. En este contexto merece la pena destacar el RD 1254/1991 sobre tratamiento de ovoproductos destinados a comedores colectivos, los planes europeos de control en gallinas reproductoras desde 1998, la directiva 2003/99/EC y los planes de control derivados con 2007 como primer año de entrada en vigor en España (Campos, 2011; Echeita et al. 2005; EFSA, 2009a y 2010a; MARM, 2010a y 2010b).

Entre los aislados de cerdo hay una mayor dispersión de serovariedades entre los procedentes del tronco ibérico (15 serovariedades frente a 9 de porcino blanco): 4,5,12:i:-, 47:i:z53, Anatum, Bredeney, Choleraesuis, Derby, Essen, Hindmarsh, Istanbul, London, Mikawasima, Montevideo, Rissen, Tomegbe y Typhimurium. Aunque la frecuencia de presentación de los nueve serotipos aislados de cerdo blanco (Tabla 4.2) no tendría por qué ser representativa de la situación de dicha micropoblación por proceder la mayoría de un muestreo dirigido, sí que están presentes prácticamente todas las serovariedades aisladas -excepto *S. Newport*- por Astorga et al. (2007) en un estudio epidemiológico sobre canales de

cerdo blanco de Andalucía, región de la que proceden estas 39 cepas de la colección. Por otro lado, estudios de campo parecen validar la hipótesis de que en general hay una mayor diversidad de serotipos entre los aislados de cerdo de cría extensiva que de aquellos más intensivos, típicamente razas de capa blanca, y que los serotipos más habituales del segundo grupo son Typhimurium y Derby, variando en función de los autores la representación de 4,5,12:i:- Rissen y Brandenburg (Astorga et al. 2007; Borge et al. 2010; EFSA, 2008 y 2009b; García-Feliz et al. 2007; Gómez-Laguna 2010; Jensen et al. 2004; Mateu et al. 2003; Vidal, 2005). El serotipo 4,5,12:i:- (variante monofásica de *S. Typhimurium* al perder el segundo antígeno flagelar codificado por el gen *fljB*), tan frecuente entre las cepas procedentes de porcino ibérico, fue aislado por primera vez en España en 1998 y desde entonces se ha convertido en uno de los serotipos más prevalentes año tras año en la casuística humana tanto en nuestro país como en otros de nuestro ámbito, llegando a ser el segundo serotipo de origen porcino causante de salmonellosis en la UE en 2007 (Echeita et al. 1999, 2001; EFSA, 2008).

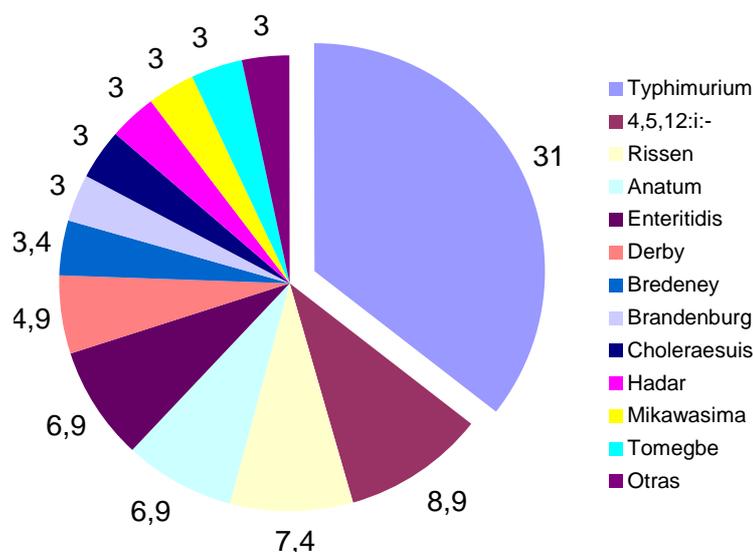


Figura 5.1. Distribución de serotipos mayoritarios (n>5) en la colección de cepas de *Salmonella*.

En cuanto a los aislados de avicultura, de nuevo nos encontramos con un cepario representativo de la prevalencia de serovariedades en las granjas españolas. Según estudios de esta última década el serotipo predominante es Enteritidis, seguido de lejos por otros como Infantis, Typhimurium, Hadar o Newport, lo cual viene a coincidir también con la situación europea (Capita et al. 2007; EFSA 2010a; Hernández, 2007; Usera et al. 2003). Por otro lado,

los estudios realizados acerca de la prevalencia de *Salmonella enterica* en aves silvestres parecen indicar que son tanto *S. Enteritidis* como *S. Typhimurium* los serotipos predominantes (Cizek et al. 1994; Dolejska et al. 2009; Literak et al. 2007; Ramos et al. 2010; Taylor y Philbey 2010). Entre las cepas analizadas en este estudio se observa la abundancia de aislados clínicos de *S. Typhimurium* en especies avícolas terrestres (perdiz roja y codorniz, más algunos casos concretos en cigüeña blanca y halcón peregrino), mientras que por otro lado en las especies aéreas (cigüeña blanca sobre todo, pero también buitre negro) se observa mayor diversidad así como coincidencias en aislamientos con los de porcino ibérico: *Enteritidis*, *Mikawasima*, *Bredeney* y sobre todo *Anatum*. De este último serotipo, habitual aunque con baja prevalencia en los estudios de campo españoles, se conservan 14 cepas, la mayoría aisladas de avicultura y porcino ibérico pero también de cigüeña blanca (n=2) y cerdo blanco (n=1). Sin embargo, ni Capita et al. (2007) ni Hernández (2007) lo aíslan en sus estudios epidemiológicos en mataderos y granjas avícolas, respectivamente. Usera et al. (2003) y Borge et al. (2010) describen tasas por debajo del 5% tanto en vacuno, porcino y aves el primero como en porcino ibérico del suroeste peninsular la segunda autora, lo cual concuerda con los datos de este trabajo. Mientras que Gómez-Laguna et al. (2010) elevan la frecuencia de *S. Anatum* a más de un 50% en su estudio sobre la prevalencia de *Salmonella enterica* en porcino ibérico en Andalucía. Al parecer este serotipo se encuentra en mayor medida en las naves de cría que de engorde en los sistemas intensivos (Mejía et al. 2006). En cualquier caso no se trataría de un serotipo de gran trascendencia clínica humana en tanto en cuanto Echeita et al. (2005) tan sólo serotiparon como *Anatum* un 0,62% de los aislados remitidos al Laboratorio Nacional de Referencia *Salmonella-Shigella* entre 1996 y 2001 y la EFSA (2009a, 2010a) no lo recoge entre las diez serovariedades más habitualmente comunicadas a dicha agencia europea. Su interés radica, por tanto, en su alta movilidad entre diversas especies hospedadoras.

5.1.2. Fagotipos

En general, los fagotipos más habituales en España, tanto en *Salmonellas* aisladas a partir de animales como de alimentos y personas, son *S. Enteritidis* PT1 y PT4, ambos representados en el cepario. Sin embargo, de los fagotipos más habituales de *S. Hadar*, PT1 y

PT8, tan sólo se detectó un aislado del primero (Capita et al. 2007; Echeita et al. 2005; Usera et al. 2003; Valdezate et al. 2007). Mucho más frecuentes que estos dos últimos son los fagotipos relacionados con el cerdo blanco; DT193, DT104, su variante DT104b y U302. Estos fagotipos son los más habituales en este tipo de ganado en España mientras que el fagotipo U311 de *S.* 4,5,12:i:-, tan abundante en este estudio (91% procedentes de cerdos ibéricos), sería prácticamente anecdótico en cerdo blanco. No obstante, éste ya ha sido descrito en cerdo ibérico al igual que DT193, muy abundante entre los aislados de este trabajo procedentes de esta raza, ya que el 93% de los casos presentan dicho fagotipo (Astorga et al. 2006; Borge et al. 2010; Gómez-Laguna et al. 2010; Vidal, 2005). Los primeros aislados de *S.* 4,5,12:i:- en España fueron fagotipados como U302, tanto en aislados de origen humano como porcino, mientras que en este estudio tan sólo se contabiliza un caso de este tipo (de la Torre et al. 2003; Echeita et al. 1999). En el estudio sobre la dispersión de dicho serotipo en Europa liderado por Hopkins (2010) predominan los fagotipos DT193 y DT120, con tan sólo cinco aislados fagotipados como DT311 y tres DT302 (de un total de 116 cepas).

En general se observa una clara asociación, dentro del serovar Typhimurium y su variante monofásica, entre los fagotipos aislados del cerdo ibérico (DT193 y U311) y los procedentes del cerdo blanco (DT104b y U302) pero con coincidencias de los de este último con los de perdiz roja y codorniz, situación que podría cambiar fácilmente habida cuenta de que la prevalencia de los distintos fagotipos de *S.* Typhimurium varía habitualmente debido a su gran movilidad genética y, en las últimas décadas, por la presión selectiva que ejercen los antimicrobianos. Ambas circunstancias nos permiten seguir el proceso de su evolución en “tiempo real” (Baquero, 2008). Así, durante la década de los sesenta del siglo pasado el fagotipo predominante de este serotipo en Inglaterra y Gales era el DT29 para dar paso a DT204 y DT193 desde mediados de los setenta hasta 1984. A partir de entonces empieza a emerger el multirresistente DT104, convirtiéndose en la actualidad en el más prevalente tanto en Europa como EEUU. Los últimos informes de la EFSA dan cada vez un mayor protagonismo a DT193, que ha incrementado su prevalencia entre 2006 y 2008 situándose entre los primeros fagotipos comunicados de la serovariedad Typhimurium de origen humano (EFSA, 2009a y 2010b; Glynn et al. 1998; McDermott, 2006). Sin embargo, en Extremadura los fagotipos DT104 y DT104b triplican en prevalencia (2007-2008) a DT193 (Campos, 2011).

5.1.3. Pulsotipos

El análisis de polimorfismos genómicos mediante macrorestricción y su resolución por electroforesis en campo pulsado (PFGE) es la técnica de discriminación clonal más utilizada en *Salmonella enterica*, estando recomendada por la red internacional PulseNet. Gracias a esta técnica se han obtenido buenos resultados para establecer las relaciones filogenéticas entre cepas de origen tanto animal como humano (Delgado-Ronda et al. 2006; Téllez, 2003; Valdezate et al. 2007).

Si tomamos como referencia *S. Typhimurium*, serotipo con más aislados, el grado de similitud entre cepas obtenido en este trabajo ha sido muy inferior al de otros estudios de nuestro entorno. Valdezate et al. (2007) determinan una similitud de entre el 64 y el 86% con un clon predominante que abarca el 41,5% de las cepas, mientras que en comparación, el clúster más amplio detectado en este trabajo para este serovar (TY09) tan sólo engloba un 19% de los aislados. Si se consideran los 38 pulsotipos para las 81 cepas de variantes mono y bifásicas de *S. Typhimurium* se obtiene una relación de 2,1 cepas por pulsotipo, mientras que Delgado (3,9), Valdezate (4,1) y Vidal (5,4) encuentran valores bien ligeramente superiores en algunos casos, e incluso duplicándolos en otros. Si se reduce el análisis a cepas de *S. Typhimurium* aisladas de animales distintos al cerdo blanco, la ratio incluso se aleja aún más de las descritas en la bibliografía, con 2 cepas por pulsotipo (2,1 en las aisladas de porcino ibérico). Para *S. Enteritidis* la ratio aumenta hasta 2,8.

De las serovariedades con 5 o más aislados en las que únicamente se obtuvo un pulsotipo (Rissen, Hindmarsh, Montevideo y Hadar), tan sólo Hindmarsh y Montevideo presentan cierta homogeneidad en su perfil fenotípico que podría correlacionar con su parecido genético. De hecho, se ha descrito que una de las limitaciones del PFGE es su baja capacidad discriminante para ciertos serotipos, entre los que destaca *S. Enteritidis*, en virtud de su baja diversidad genética (Bakeri, 2003; Landeras, 1996; Valdezate et al. 2007). Tan sólo Téllez (2003), en su estudio epidemiológico a partir de reptiles sanos y enfermos, tanto cautivos como de vida libre, obtiene una relación aislados/pulsotipo de 1,8; bastante similar a la descrita en este trabajo.

Ha sido frecuente también en este estudio que varios fagotipos compartan el mismo pulsotipo. Este extremo está descrito en la literatura y se debe a la existencia de cierta relación genética entre ellos y a que la fagotipia puede variar cuando las bacterias adquieren plásmidos o transposones, sin la necesidad de que esto suponga cambios detectables por PFGE (Lawson et al. 2002; Prichett et al. 2000).

Para la elaboración de este estudio y por la naturaleza de sus objetivos se ha primado la dispersión de aislados, tanto geográfica como temporalmente, llegando el muestreo hasta las 14 especies hospedadoras de diversos sistemas de manejo y procedentes de tres laboratorios de diagnóstico distintos. Fruto de ello es que en este trabajo se ha descrito una diversidad clonal acorde a lo esperado en virtud de la diversidad de orígenes de las cepas, lo cual no es óbice para que se pueda obtener información de cara al estudio de los determinantes de resistencia y su dispersión. Además se ha podido observar la gran separación entre las micropoblaciones procedentes de porcino ibérico y blanco (tan sólo comparten tres pulsotipos: CH2, TY13 y RI1), así como la existencia de tres pulsotipos que se repiten en cepas aisladas de animales de abasto y silvestres: *S. Enteritidis* EN01 (aislado de jabalí y avicultura), EN02 (cigüeña blanca y avicultura) y *S. Typhimurium* TY48 (de perdiz roja y cerdo blanco, ver Tabla 4.4) lo cual viene a confirmar la relevancia de la fauna silvestre en relación a la epidemiología de esta zoonosis.

Los animales silvestres no sólo forman parte de los ciclos biológicos de numerosos parásitos y microorganismos sino que además son responsables directos de brotes epidémicos en el ser humano amén de ser reservorio habitual de salmonelas para las producciones animales (Alley et al. 2002; Kapperud et al. 1998; Pennycott et al. 2006). Hernández (2007), en su trabajo de tesis doctoral sobre la epidemiología de *Salmonella enterica* en lotes de gallinas ponedoras de la Comunidad Valenciana, encontró muestras positivas a dicho microorganismo en un 18% de las heces de paseriformes halladas en las naves de producción, siendo los serotipos zoonóticos predominantes: Infantis (18,8%), Hadar (18,8%) y Enteritidis (12,5%). No parece ser éste el caso para las cepas de *S. Enteritidis* descritas en este trabajo, dónde haría falta el concurso de algún pájaro silvestre capaz de evadir las medidas de bioseguridad habituales en avicultura intensiva, infranqueables en términos generales, para una cigüeña blanca o un jabalí. Sin embargo, el clon TY48, aislado a partir de dos casos

clínicos de perdiz roja y un cerdo blanco muestreado en matadero (los tres en 2004) sí que permite elucubrar un contacto más directo. Aunque no se dispone de datos epidemiológicos, por lo que se desconoce si este extremo fue posible, la oportunidad de contagio recíproco entre animales silvestres y domésticos en régimen extensivo o semiextensivo (aunque no fuera el caso) es, a priori, más probable (Gómez-Laguna et al. 2010; Jensen et al. 2004).

De hecho organismos internacionales como la OIE vienen advirtiendo desde hace años de la trascendencia que para la salud pública tiene la monitorización sanitaria de la fauna silvestre (Bengis et al. 2002; Williams et al. 2002). Pese a que la salmonelosis no parece haber despertado aún gran atención en este sentido, las evidencias encontradas en este y otros estudios aquí citados sugieren que podría tratarse de un campo de trabajo prioritario en aras de conocer los ciclos de las salmonelas en los ecosistemas y establecer las medidas de control más adecuadas no sólo para controlar su prevalencia sino también la dispersión de resistencias (Palomo et al. 2011), máxime cuando quizás las dos salmonelas de mayor trascendencia clínica hoy por hoy provienen de la fauna silvestre: *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* DT104. Previamente a la década de 1960, el serotipo Enteritidis no estaba especialmente asociado a la avicultura, sin embargo los programas de erradicación sobre *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* -responsables de graves pérdidas económicas al sector aunque sin importancia en salud pública- dejaron libre un nicho ecológico que pronto sería ocupado por *S. Enteritidis* a partir de su reservorio natural: los roedores (Rotger, 2008). Así mismo, los primeros aislamientos europeos del fagotipo multirresistente *S. Typhimurium* DT104 se realizaron en gaviotas y ganado vacuno en el Reino Unido en 1984, aunque parece ser que su origen estaría en la importación de aves exóticas desde Indonesia y Hong Kong (Threlfall et al. 2000).

5.2. Fenotipos de resistencia.

Los antimicrobianos a los que más resistencia ha mostrado este cepario; tetraciclina, sulfametoxazol, estreptomina y ampicilina, están entre los primeros en ser descubiertos (1948, 1930, 1943 y 1961, respectivamente), y todos ellos con un intervalo de unos 10 años entre su utilización y la aparición de resistencias (Walsh, 2003). Estos cuatro antimicrobianos han sido o son utilizados en medicina humana y veterinaria, bien en tratamientos, como promotores del crecimiento y para profilaxis, exceptuando el sulfametoxazol (Salyers y Whitt,

2005). Esta utilización desde hace más de 50 años, también en animales, podría ser la causa de las altas tasas de resistencia a los antimicrobianos (Angulo et al. 2004).

La relación entre antigüedad y volumen del consumo y resistencia a los antimicrobianos se ve claramente en el caso del cloranfenicol y el florfenicol. Del primero, aunque originalmente usado sólo en el hombre desde 1947, había ya más de 160 preparados medicamentosos para los animales poco antes de ser prohibido para tal fin en 1994 (Nogareda, 1988). Agustín et al. (2005), en un estudio a partir de salmonelas aisladas de cerdos, describen un incremento en la resistencia a cloranfenicol del 38 al 67,7% entre 1993 y 2001. En el estudio objeto de esta memoria se ha encontrado una tasa de resistencia del 22,6% frente a este compuesto entre los microorganismos del cepario no procedentes de cerdo blanco, mientras que para el florfenicol, no autorizado para uso humano y de uso poco extendido en ganadería (en 1988 no había descrito aún ningún preparado para el mercado español), la resistencia es mucho menor (4,9%). Este hecho pudiera ser debido no sólo a ser más reciente su uso en animales sino también a que esta utilización se restringe a unas pocas prescripciones clínicas. Se debe tener en cuenta también la resistencia cruzada debida al gen *floR*, mientras que *cat* y *cml* solo confieren resistencia a cloranfenicol (Michael et al. 2006). De hecho, las 8 cepas de la colección resistentes a este antimicrobiano -procedentes de animales enfermos y aisladas en la Facultad de Veterinaria de Córdoba- presentaron resistencia frente a ambos antimicrobianos, doble resistencia previamente descrita en cepas de *S. Typhimurium* DT104 aisladas de cerdos tanto sanos como enfermos (García-Feliz et al. 2008; Vidal, 2005).

Tabla 5.1. Cepas resistentes a florfenicol de este trabajo.

Nombre	Año	Especie	Serotipo	Fagotipo
CC65	2008	Porcino ibérico	Derby	
CC66	2008	Porcino ibérico	Typhimurium	NT
CC64	2007	Porcino ibérico	Typhimurium	U310
C19	2000	Perdiz	Typhimurium	U302
C6	1998	Codorniz	Typhimurium	104b
C7	1998	Perdiz	Typhimurium	104b
C3	1997	Canario	Typhimurium	104b
C4	1997	Canario	Typhimurium	104

La espectinomicina presenta también unas tasas moderadas de resistencia (23,8%), consecuencia más que probable de su uso limitado en ganadería (Aiello, 2000). Neomicina y apramicina presentan tasas de resistencia inferiores (15,9% y 3,1%, respectivamente), siendo el primero apenas utilizado en clínica humana ni veterinaria, mientras el segundo únicamente está autorizado para uso veterinario (Guardabassi y Courvalin, 2006). El resto de aminoglicósidos -muchos de los cuales comparten determinantes de resistencia- tienen tasas de resistencia bastante superiores al 30%: como la kanamicina (33,6%), la gentamicina (34,8%) y sobre todo la estreptomina (54,3%). Todos son muy utilizados en ganadería (sobre todo la gentamicina) y también en clínica humana (los dos últimos). De hecho, la estreptomina se considera indicadora de la presencia de la SGI1 y/o integrones (Bronzwaer et al. 2008). Estudios de sensibilidad realizados sobre salmonelas procedentes de animales y/o alimentos en España, distanciados los aislamientos entre cuatro y ocho años durante la década de 1990, vienen a demostrar también este incremento de las tasas de resistencia, llegando a doblarse en aquellos compuestos más recientemente introducidos como sería el caso de estos aminoglicósidos distintos a la estreptomina (Agustín et al. 2005; Usera et al. 2002).

La distribución de los valores de CMI para los **beta-lactámicos** más antiguos parece apuntar a la importancia de las beta-lactamasas como mecanismo de resistencia a estos antimicrobianos, pues mientras con la ampicilina y la amoxicilina por sí solos hay que llegar a altas concentraciones del compuesto para aumentar su efectividad, con el concurso sinérgico del clavulanato -inhibidor de las beta-lactamasas- los valores de CMI se muestran más regulares (Figura 4.3; Salyers y Whitt, 2005). Así mismo, la alta tasa de resistencia a amoxicilina-clavulánico, aunque con valores moderadamente elevados de CMI50 y CMI75, pudiera deberse al concurso de beta-lactamasas del grupo funcional 2 que según Bush et al. (1995) no son siempre totalmente inhibidas por el clavulanato.

La mayor resistencia a **quinolonas** en aislados de origen avícola parece responder a un uso más intenso del ácido nalidíxico y de la enrofloxacin en la avicultura que en el resto de explotaciones ganaderas (Lestari et al. 2009). La ciprofloxacina no se puede prescribir a animales, pero suele presentar resistencias cruzadas con la otra fluoroquinolona estudiada (Bronzwaer et al. 2008). Desde la autorización de la enrofloxacin en España (1986), la

sensibilidad a quinolonas no ha dejado de disminuir (Usera et al. 2002), lo cual no deja de ser paradójico cuando está terminantemente prohibida la profilaxis con estos compuestos en avicultura y en cualquier caso supuestamente son infrautilizados (Moreno, 2009). Sin embargo, en la UE no se llega al extremo de su total prohibición en este tipo de explotaciones como sería el caso de EEUU (septiembre 2005) a raíz de las alarmantes tasas de resistencia en enterobacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias: *Campylobacter* spp y *Salmonella enterica* (Lestari et al. 2009).

Las tasas de resistencia más elevadas en las dos **cefalosporinas** más antiguas ensayadas, cefalotina y ceftiofur, se puede deber a un periodo de utilización más prolongado. La resistencia a ceftiofur se da sobre todo entre las cepas de origen clínico. La cefalotina es de uso únicamente humano mientras el primero es muy utilizado en medicina veterinaria por ser, al igual que cefquinoma, una cefalosporina de amplio espectro (Guardabassi y Courvalin, 2006).

En cuanto a las mayores tasas de resistencia a cefquinoma respecto al resto de cefalosporinas (a pesar de ser de cuarta generación), se ha de señalar que éstas no parecen haber sido condicionadas por la utilización del punto de corte recomendado por EUCAST para *Escherichia coli* ante la ausencia de datos para *Salmonella enterica*. Si se observan los valores de CMI₅₀, 75 y 90 (ver anexos) se puede constatar una baja sensibilidad de los aislados del cepario más allá de los aislados multirresistentes de cerdo blanco, especialmente en los serotipos de origen mayoritariamente porcino -Typhimurium y Choleraesuis- así como en *S. Enteritidis* de avicultura intensiva. Cefquinoma se puede prescribir para tratamientos individualizados en bóvinos (1994) y en porcino (1999), no estando autorizado para aves como el resto de cefalosporinas de amplio espectro, de modo que lo más probable es que exista resistencia cruzada con otros beta-lactámicos, gracias a la acción de las beta-lactamasas de amplio espectro y/o al concurso de bombas MDR (Greko et al. 2009; Li et al. 2007).

Aunque los autores que han realizado estudios de sensibilidad a los antimicrobianos en aislados de *S. enterica* de origen animal destacan la poca resistencia a quinolonas (menor del 15%) y cefalosporinas (a ceftiofur únicamente), en gran medida pueden deberse a utilizar puntos de corte clínicos en vez de epidemiológicos, como los recomendados por la EFSA. En

cualquier caso, tanto con un criterio como con el otro se observa la evolución hacia una pérdida de sensibilidad paulatina a cefalosporinas y quinolonas (Agustín et al. 2005; Astorga et al. 2007; Capita et al. 2007; EFSA, 2010b, 2010c; García-Feliz et al. 2008; Mateu et al. 2002).

5.2.1. Según la especie de origen.

Si se comparan los datos de CMI para las cepas de este trabajo con los aportados por la EFSA (2010a) para el periodo 2004-2007 -en el que se concentran la mayor parte los aislados (sobre todo de origen porcino ibérico y avicultura)- se observan las mismas diferencias en cuanto a las tasas de resistencia en función del origen. Es decir, mayor resistencia en los aislados de origen porcino, sobre todo a los antimicrobianos abarcados en la denominada pentarresistencia (AMP-CHL-STR-SUL-TET) asociada a *S. Typhimurium* mono y bifásica, y por otro lado a las quinolonas en los aislados de origen aviar, en gran medida atribuible a las cepas de *S. Enteritidis*. La agencia europea alerta en su informe de las grandes diferencias en cuanto a la sensibilidad al ácido nalidíxico y a la ciprofloxacina en función del país. Para estos antimicrobianos, las mayores resistencias se encuentran en España, con 64,8 y 69,1%, respectivamente, en 2007, frecuencias que son superiores a las encontradas entre los aislados de origen aviar analizados en este trabajo, que son 53,8 y 50%, respectivamente.

En general la resistencia a las cefalosporinas es anecdótica, al igual que se ha observado en este trabajo más allá del grupo de cepas multirresistentes procedentes de cerdo blanco. En este panorama, la relativamente alta tasa de resistencia a ceftazima en aislados procedentes de cerdo ibérico (4,9%) no encuentra parangón en ningún país de los que han aportado datos de la especie porcina. De hecho, sólo se han encontrado tasas positivas en dos países: España (1,3%) e Irlanda (3%). Sin embargo, los Países Bajos presentan una resistencia del 12,8% a este compuesto en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de aves en 2007 que, unido a la resistencia en Países Bajos y España para cefotaxima (13% y 8%, respectivamente), constituyen las mayores tasas descritas para cefalosporinas. En el informe para el año 2008, los datos aportados por España son más discretos (1,2 y 0,8% respectivamente), mientras que a las tasas superiores al 10% de los Países Bajos se incorpora Italia con un 11,8% para cefotaxima y 12,5% para ceftazidima, lo que da una idea de la disparidad de datos, no sólo entre países sino también por su irregular evolución temporal (EFSA, 2010b).

En ninguno de los cuatro años contemplados por los estudios de la EFSA (2004-2008) se encuentran datos similares a los obtenidos en este trabajo en cuanto a la mayor resistencia existente frente a neomicina, kanamicina y gentamicina entre los aislados de origen avícola. En ambos trabajos se presentan tasas mayores de resistencia a gentamicina (único antimicrobiano contemplado en las dos especies) entre los aislados de origen porcino, aunque las frecuencias se mantienen por debajo del 10% para todos los países excepto para España, con un 10,5% de resistencia para la gentamicina en 2007 y Alemania, con frecuencias del 11% y del 15,2% para la resistencia a la neomicina en 2007 y en 2006, respectivamente. Del mismo modo, Usera et al. (2002) encuentran mayores tasas de resistencia a este antimicrobiano en los aislados procedentes de porcino. Valdezate (2007) y antes Cruchaga (2001) describieron también mayor resistencia a gentamicina y kanamicina entre las cepas de *S. Typhimurium* que entre las de *S. Enteritidis*. Por otro lado, Carramiñana (2004) y Capita (2007), en estudios de resistencia de *Salmonella enterica* aisladas en mataderos de pollos, encuentran una mayor resistencia a neomicina en *S. Enteritidis* el primero y tasas cercanas a cero el segundo, tanto a kanamicina como a gentamicina.

Respecto a los los aislados del cerdo ibérico, la práctica ausencia de trabajos previos, más allá del de Gómez-Laguna et al. (2010) y Borge et al. (2010), obliga a contrastar los resultados de este trabajo únicamente con los informes de la EFSA (Tabla 5.2), cuyo método ha sido el adoptado para realizar este estudio de resistencia fenotípica. Los aislados procedentes de cerdos ibéricos presentan mayores tasas de resistencia frente a tres de los antimicrobianos más antiguos y, por otra parte, relacionados con la pentarresistencia, como son estreptomomicina, tetraciclina y en menor medida espectinomomicina. Sin embargo, los datos de años anteriores muestran que las tasas de resistencia de los aislados españoles son claramente superiores. Otros estudios también sitúan la micropoblación de salmonelas aisladas de porcino en España entre las más resistentes de Europa y, en el caso de la tetraciclina, con cifras de CMI superiores a las de las cepas de cerdo ibérico descritas en este trabajo (Bywater et al. 2004; de Jong et al. 2009).

Para el sulfametoxazol, los aislados de cerdo ibérico presentan tasas altas pero prácticamente idénticas a las de España y a las máximas de Europa, mientras que para

cloranfenicol y ampicilina (también incluidos en la pentarresistencia) las frecuencias de resistencia entre los aislados del cerdo ibérico son prácticamente la mitad tanto en comparación con los procedentes de Irlanda como con *S. Typhimurium* de España. La resistencia a trimetoprim de *S. Typhimurium* aislado de cerdo ibérico también presenta tasas altas al igual que frente a gentamicina (luego se volverá sobre este antimicrobiano cuando se analice la resistencia por serotipos). Frente al resto de antimicrobianos se detectan tasas menores que para los aislados de España o Europa, destacando, por su trascendencia para la salud pública, la baja resistencia a las quinolonas.

Tabla 5.2. Resistencia frente a los antimicrobianos entre los aislados de *Salmonella* procedentes del cerdo ibérico de este trabajo, de porcino en España y máximas de Europa según la EFSA (2010a) para el año 2007. IT: Italia, IR: Irlanda, GN: Alemania, SP: España, DK: Dinamarca, ST: Estonia, ND: Países Bajos, PO: Polonia.

AMR	Cerdo ibérico		Cerdo (España)		Tasas máximas (país)	
	<i>Salmonella</i> spp	<i>Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>Typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>Typhimurium</i>
TET	71,8	93,5	56,9	84,2	63,6 (IT)	84,1 (GN)
CHL	24,3	45,2	22,2	78,9	45,5 (IR)	78,9 (SP)
FLR	2,9	6,5	4,2	26,3	34,8 (IR)	58,8 (PO)
AMP	15,5	90,3	34,9	66,7 (2004)	54,5 (IR)	76,5 (PO)
CTX	1	3,2	0,6	0	5,3 (ST)	5 (SP, 2005)
CAZ	4,9	0	1,3	-	3 (IR)	2,4 (IR)
XNL	1,9	6,5	-	-	0,2 (DK)	0,2 (DK, 2006)
SUL	58,3	83,9	54,2	-	59,1 (IR)	88 (GN)
TMP	35	61,3	33,7	-	35,4 (NL)	31,7 (IR)
APR	4,9	9,7	1,9 (2006)	3,7	1,2 (DK)	3,7 (SP)
GEN	31,1	12,9	7,2	10,5	7,2 (SP)	10,5 (SP)
NEO	9,7	12,9	5,1	0	8,3 (DK)	11 (GN)
SPT	27,2	58,1	-	-	16,7 (DK)	16,7 (DK)
STR	63,1	93,5	33,5	42,1	43,1 (DK)	79,3 (GN)
CIP	3,9	0	18	10,5	21 (ST)	10,5 (SP)
NAL	4,9	0	16,8	10,5	38,6 (PO)	58,8 (PO)

Gómez-Laguna et al. (2010), utilizando la técnica Kirby-Bauer de difusión en disco, encuentran datos similares a los de este trabajo en cuanto a las bajas tasas de resistencia frente a los antimicrobianos de última generación (cefalosporinas y quinolonas), y algo mayores frente a los compuestos de utilización menos reciente, aunque no tan altas como en el caso de las cepas analizadas en este trabajo. Estos autores obtuvieron un 6,9% de resistencia a ácido nalidíxico y una total sensibilidad frente a ciprofloxacina, enrofloxacin y las tres cefalosporinas ensayadas. En cualquier caso, deben tenerse presentes las diferencias entre ambos estudios, ya que además de las diferencias de metodología, la distribución de serotipos es distinta entre ambos ceparios, un 55,8% y 23,3% de *S. Anatum* y *S. Typhimurium*, respectivamente, frente al 5% y al 30%, de este estudio. Por otro lado, el trabajo de Borge et al. (2010), con un muestreo más amplio e idéntica técnica para medir la sensibilidad a los antimicrobianos que Gómez-Laguna et al. (2010), arroja resultados muy similares a los nuestros: tasas de resistencia superiores al 90% frente a tetraciclina, estreptomicina, ampicilina y sulfamidas pero menores a cloranfenicol (73,3%); y total sensibilidad a cefquinoma y fluoroquinolonas.

5.2.2. Según serovariedades, fagotipos y pulsotipos.

La mayor resistencia de *S. Typhimurium* y su variante monofásica 4,5,12:i:- (ésta incluso en mayor medida) a penicilinas, aminoglicósidos (estreptomicina principalmente), fenicoles, tetraciclina y sulfamidas está muy bien contrastada en la literatura; del mismo modo, *S. Enteritidis* y otros serotipos asociados a la avicultura (como Hadar e Infantis) presentan tasas de resistencia mayores a las quinolonas (Alcaine et al. 2007; Agustín et al. 2005; Echeita et al. 2005; EFSA, 2010b y 2010c; McDermott, 2006). No se encuentran, sin embargo, muchos estudios que se refieran a serovariedades tan poco habituales en animales de abasto como Mikawasima y Tomegbe, que en este estudio son los responsables de las altas tasas de resistencia a gentamicina y kanamicina (para este compuesto solo el segundo serotipo) entre los aislados procedentes del cerdo ibérico, tronco racial al que se deben 10 de estos 11 aislamientos y del que hay muy pocos trabajos publicados (Borge et al. 2010; García-Feliz et al. 2007; Gómez-Laguna et al. 2010).

El serotipo Choleraesuis está asociado a brotes septicémicos de salmonelosis en cerdos

(Tabla 1.2), y de manera similar, dos de los seis aislados de nuestra colección proceden de casos clínicos. Estas seis cepas presentan un perfil de macrorrestricción muy similar, lo que unido a sus semejantes características fenotípicas (baja sensibilidad a los antimicrobianos) sugiere la existencia de una estrecha relación genética.

S. Derby y *S. Rissen* son también serotipos habituales en los estudios epidemiológicos de *Salmonella*, mostrando normalmente baja sensibilidad a los antimicrobianos aunque en menor medida que *S. Bredeney* y *S. Brandenburg*, tanto en la resistencia frente a un antimicrobiano al menos como en multirresistencia. *S. Brandenburg* tan sólo cuenta con seis aislados distribuidos en dos clones (de 4 y 2 cepas cada uno) procedentes todos de porcino blanco. Está descrita la alta resistencia de cepas de este serotipo aisladas de este tronco racial así como de casos clínicos humanos con una alta prevalencia de determinantes de diseminación horizontal (Astorga et al. 2007; García-Feliz et al. 2008; Martínez et al. 2007; Mejía et al. 2006; Vidal, 2005).

S. Anatum, serotipo heterogéneo en cuanto a sensibilidad y de gran diversidad genética (con 9 pulsotipos para 14 cepas), ha mostrado en general poca resistencia frente a los antimicrobianos, ya que únicamente tres cepas son multirresistentes. Estas son de origen porcino, procediendo de un cerdo blanco la que presenta el perfil de antibiorresistencia más amplio: AMP-AMX-AMC-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL. Mejía et al. (2007) también describieron cepas de este serotipo aisladas de cerdos más sensibles a los antimicrobianos que las de los otras serovariedades ya discutidas, aunque menos sensibles que otras, aún menos habituales, como *Diarizonae* o *Goldcoast*. También Gómez-Laguna (2010), en su estudio sobre salmonelas de cerdo ibérico, aunque no analiza las diferencias entre serovariedades sí que presenta tasas de resistencia relativamente bajas (sobre todo en cuanto a multirresistencia) en un cepario donde predomina *S. Anatum* (56%) frente a un 23% de *S. Typhimurium*, como ya se ha comentado. Mientras que Borge et al. (2010) detectaron un 93,33% de multirresistencia en un cepario en el que predominaba el serovar *Typhimurium* (35,7% de los aislados).

Al hacer la comparación de la resistencia frente a las cefalosporinas entre serotipos, distinguiendo el grupo de las cepas aisladas del cerdo blanco de las que tienen otros orígenes,

se observa que las serovariedades más resistentes son *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Brandenburg* y *S. Rissen*. Todos estos serotipos son típicos del cerdo y, al igual que los más frecuentemente aislados de las aves (*Enteritidis*, *Hadar* e *Infantis* en nuestro caso), potencialmente zoonóticos. Su importancia clínica radica en que los antimicrobianos frente a los que son resistentes, cefalosporinas o quinolonas, son cruciales para el tratamiento de niños con salmonelosis aguda. De hecho, se han detectado tanto casos clínicos como brotes de salmonelosis con estas mismas características en la comunidad de Extremadura (Angulo et al. 2000, 2004; Campos, 2011; Martínez et al. 2007).

Las resistencias aquí descritas para los fagotipos de *S. Typhimurium* y *S. 4,5,12:i:-* (DT193, DT104, DT104b y U302) se repiten en estudios de otras partes del Globo, desde Europa a EEUU. Ya desde su aparición, en la década de 1980, *S. Typhimurium* DT104 (posteriormente también su variante 104b) despertó cierta alarma por su baja sensibilidad a antimicrobianos de primera elección en terapia clínica, como la ampicilina, el cloranfenicol o el trimetoprim-sulfamidas, además de a la tetraciclina y a la estreptomina, habituales en tratamientos veterinarios y como promotor del crecimiento (el primero). Similar patrón de resistencia ha presentado U302 mientras que DT193 destaca por su mayor sensibilidad a beta-lactámicos y al cloranfenicol y, por lo tanto, se le presupone una menor multirresistencia (Whichard et al. 2010). Sin embargo no hemos observado una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a una mayor resistencia de este último fagotipo frente a la kanamicina, tal y como había sido descrito por otros autores (Akkina et al. 1999; Alcañe et al. 2007; Gebreyes et al. 2002; McDermott, 2006; Thornton et al. 1993; de la Torre et al. 2003; Valdezate et al. 2007).

5.2.3. En función del sistema de explotación.

Aunque los datos de este trabajo sugieren que no hay una relación aparente entre sistema de explotación y resistencia a los antimicrobianos, el hecho de que la distribución de especies animales y serovariedades según el tipo de sistema de explotación no es homogénea entre los distintos grupos que hemos considerado podría estar enmascarando los resultados, como ha sido sugerido por la EFSA (2010b). Aproximadamente la mitad de las cepas de *S. Typhimurium* proceden del grupo de cerdos de montanera, frente a tan sólo un 4% de este

mismo serotipo dentro de la agrupación cebo+recebo. También el 70% de las cepas de *S. Derby* se concentran entre los aislados procedentes de montanera. Con la variante monofásica no se llega a la situación inversa pero el porcentaje de *S. 4,5,12:i:-* llega al 41,2% dentro del grupo cebo+recebo y un poco más entre los procedentes de montanera (47,1%). Estos tres serotipos están entre los más resistentes, por lo que un desequilibrio en su distribución contribuye en la misma medida a las frecuencias de resistencia frente a los antimicrobianos, alterándose la prevalencia detectada según se trate de salmonelas aisladas de animales en un sistema más o menos intensivo (Tabla 5.3).

También las serovariedades más sensibles están irregularmente representadas. Así, *S. Hindmarsh* se concentra en montanera, *S. Enteritidis* en el grupo más intensificado y *S. Anatum* a partes iguales entre montanera y máxima intensificación pero con el doble de peso relativo en el segundo. De hecho esta distribución asimétrica de serovariedades es la que está determinando la sensibilidad a según qué antimicrobianos entre los distintos grupos de intensificación en los que se ha dividido el cepario, coincidiendo la tendencia del grupo con la de los serotipos predominantes en él tal y como advierten los informes de la EFSA ya citados (2010b y 2010c). Así, en producciones intensivas (prácticamente el 100% de avicultura y por tanto con abundancia de *S. Enteritidis*, *S. Hadar* y *S. Infantis*) predominan las resistencias a quinolonas y neomicina; en cerdos ibéricos de montanera abunda la pentarresistencia (faltaría cloranfenicol pero también muestra valores de CMI altos), mientras que en el grupo de otros (0) los valores de CMI más elevados pudieran deberse a que proceden de aislamientos de casos clínicos, siendo los antimicrobianos a los que muestran menos sensibilidad las cefalosporinas, el florfenicol y el cloranfenicol, utilizados habitualmente en tratamientos veterinarios (Aiello, 2000).

Al aplicar el análisis por serotipos (*S. Typhimurium* mono y bifásica) los resultados que se obtienen son más previsibles. La menor sensibilidad a los antimicrobianos del grupo 0 se debería a que dichas salmonelas fueron aisladas de casos clínicos pese a proceder los hospedadores de sistemas de manejo a priori menos intensivos, como por ejemplo los seis casos de cerdo ibérico en régimen extensivo o nueve de aves silvestres. Lamentablemente se cuenta con una distribución de serotipos muy irregular entre los aislados de cerdos de montanera, cebo y recebo por lo que el análisis tan sólo ofrece resultados estadísticamente

significativos para unos pocos quimioterápicos, en los que se ve claramente la correlación entre intensificación y pérdida de sensibilidad a los antimicrobianos. También el equipo de Lucas Domínguez (2009) ha constatado la asociación entre sistema de manejo porcino y sensibilidad antibiótica, dándose las mayores tasas de resistencia en cerdo blanco seguido por los distintos tipos de acabado en el cerdo ibérico: cebo, recebo y finalmente montanera.

Tabla 5.3. Recuento de cepas no aisladas de cerdo blanco en función del grado de intensificación. Cerdo ibérico en montanera: 1; cerdo ibérico en cebo y recebo: 2; régimen intensivo: 3; resto de aislados: 0.

Serotipo	Intensificación				TOTAL
	0	1	2	3	
4,12:b:-	1	0	0	0	1
4,5,12:i:-	2	8	7	0	17
47:i:z53	0	2	0	0	2
Abony	1	0	0	0	1
Abortusovis	3	0	0	0	3
Agona	1	0	0	0	1
Anatum	3	5	0	5	13
Bredeney	1	3	1	0	5
Choleraesuis	1	2	2	1	6
Derby	1	7	2	0	10
Enteritidis	4	0	0	10	14
Essen	0	0	3	0	3
Hadar	0	0	0	5	5
Hindmarsh	0	5	0	0	5
IIIb 47:k:z35	1	0	0	0	1
Infantis	0	0	0	4	4
Istanbul	0	0	2	0	2
London	0	0	2	0	2
Mikawasima	1	3	2	0	6
Montevideo	0	3	2	0	5
Othmarschen	0	0	0	1	1
Rissen	1	2	1	0	4
Tomegbe	0	3	3	0	6
Typhimurium	21	23	2	1	47
TOTAL	42	66	29	27	164

De manera análoga, otros autores han evidenciado una menor tasa de resistencia a los antimicrobianos en aquellas bacterias (*Salmonella enterica* y otras zoonóticas de transmisión alimentaria, ZTA) aisladas de animales criados en sistemas libres de antimicrobianos (ecológicos, por ejemplo), e incluso una menor frecuencia de infección. En general se ha

comprobado que en Europa hay una relación entre sistema de manejo y prevalencia de las salmonelas en gallinas de puesta, aumentando ésta a mayor intensificación: ecológicas, camperas, en suelo y por último de jaulas en batería (EFSA, 2007). Hoogenboom et al. (2008) a partir de un chequeo para las principales ZTA en 31 granjas de porcino y 19 de avicultura hallaron un 30% de las heces de cerdo positivas a *Salmonella* y tan sólo una granja positiva de entre las que habían comenzado la conversión a ecológico hacía más de seis años. No se encontró *Salmonella* en ninguna granja de engorde de pollos y únicamente en una de gallinas de puesta.

Por otro lado, Gebreyes et al. (2006b) aunque ratifican las menores tasas de resistencia a los antimicrobianos en las granjas de cerdos libres de antibióticos (si bien remarcan que la pentarresistencia estaba igualmente asociada a éstas, concluyendo que las cepas resistentes persisten a pesar de cesar la presión antibiótica) sí encuentran una prevalencia de *Salmonella* spp. mayor en estas granjas (15,2% frente al 4,2% de las convencionales).

Trabajos con muestreos insuficientes o con un alcance menor arrojan resultados similares: menor resistencia a los antimicrobianos en las explotaciones menos intensificadas y prevalencias de salmonelas variables para uno u otro sistema de manejo (Bailey y Cosby 2005; Lestari et al. 2009; Jensen et al. 2006; Melendez et al. 2010). Más concretamente, Gómez-Laguna et al. (2010) aislaron salmonelas en un 5,3% de los cerdos ibéricos y un 33% de los lotes muestreados en Andalucía. Por su parte, Borge et al. (2010) analizaron un total de 2.028 muestras de nódulos ileocecales correspondientes a 168 explotaciones de cerdos ibéricos de montanera recolectadas en nueve mataderos del Suroeste peninsular (incluido Portugal). La prevalencia de individuos y lotes positivos a *Salmonella* fue del 9,8 y 37,5%. Cifras, en ambos estudios, inferiores al 12,5 y 43,1%, respectivamente, de García-Feliz (2007) en un trabajo de muestreo muy exhaustivo sobre cerdos procedentes de todo tipo de granjas de la Península Ibérica. Y bastante menores del 29 y 51,3%, para canales de matadero y granjas de cría españolas, de los muestreos dirigidos por la EFSA (2008, 2009b) de cara a implementar los planes de control de *Salmonella* para esta especie ganadera.

5.2.4. Multirresistencia y perfiles de antibiorresistencia.

Al no haber apenas estudios que utilicen la metodología recomendada por la EFSA, la

comparación de los datos de prevalencia de la multirresistencia con otros estudios es complicada. Sin embargo, el análisis de la distribución entre los grupos analizados en este trabajo permite constatar lo ya descrito por otros autores: una mayor multirresistencia entre los aislados de origen porcino y sus serotipos más habituales (4,5,12:i:-, Typhimurium, Brandenburg, Bredeney y Choleraesuis, así como Derby y Rissen en menor medida). No obstante, las salmonelas también asociadas a porcino (ibérico en nuestro caso), que son *S. Anatum*, *S. Mikawasima* y *S. Tomegbe*, presentan tasas bastante menores de multirresistencia cuando no son totalmente sensibles (García-Feliz et al. 2007; Gebreyes et al. 2004; Thorsteinsdottir et al. 2007).

Los últimos trabajos epidemiológicos sobre muestras control de canales de cerdo en matadero han arrojado resultados globales de altas tasas de multirresistencia en nuestro entorno más inmediato: 56% en España (García-Feliz et al. 2008), 64% en Andalucía (Astorga et al. 2007), 50% en Cataluña (Mateu et al. 2002) y 77% en Castilla y León (Vidal, 2005). Mientras que Gómez-Laguna et al. (2010), analizando salmonelas procedentes únicamente de cerdo ibérico y más de la mitad serotipadas como *Anatum*, rebajan la multirresistencia a un 36% de su cepario, otros autores también describen a *S. Anatum* como una de las serovariedades más sensibles aunque en menor medida que las procedentes de cerdo ibérico (Astorga et al. 2007; Mateu et al. 2002; Mejía et al. 2006; Vidal, 2005). Los serotipos más frecuentemente asociados a productos de origen porcino aislados de casos clínicos humanos presentan igualmente esta mayor tendencia a la multirresistencia que los aislados de otros orígenes, sobre todo el aviar (Alcaine et al. 2007; Campos, 2011; Echeita et al. 2005; McDermott, 2006).

La elevada frecuencia entre las cepas analizadas en este trabajo de la pentarresistencia (AMP-CHL-STR-SUL-TET) y su relación con el serotipo Typhimurium coincide con lo descrito tanto para España como para Europa y EEUU (García-Feliz et al, 2008; Gebreyes et al. 2004; de Jong et al. 2009). Sin embargo, la relación de este patrón con el serotipo Brandenburg, aunque recogida en algunos estudios, apenas ha despertado interés quizás porque su importancia en la salud pública española comenzó a disminuir hace una década (Echeita et al. 2005; Martínez et al. 2007). Por otro lado, existen precedentes de cepas

pentarresistentes en *S. Bredeney*, *S. Anatum*, *S. 4,5,12:i:-* y *S. Rissen* pero no así en *S. Hindmarsh* (Astorga et al. 2007; García-Feliz et al. 2008; Mejía et al. 2006; Porrero et al. 2002).

Tabla 5.4. Asociación de la pentarresistencia a la resistencia frente a quinolonas y/o cefalosporinas.

ACSSuT +	Serotipo	Fagotipo (pulsotipo)	Especie de origen (cepas)
CEF-XNL-CTX-CFQ-NAL-ENR-CIP	4,5,12:i:-	DT193 (MO3)	Perdiz (C48)
	Typhimurium	DT29 (TY48)	Porcino blanco (P57)
		DT204a (TY15)	Perdiz (C38)
CIP	Brandenburg	BA1	Porcino blanco (P10)
XNL-CFQ	Rissen	R11	Porcino blanco (P33)
	Typhimurium	NT (TY58)	Porcino ibérico (MP49)
CEF	Rissen	R11	Porcino blanco (P34)
	Typhimurium	NT (TY53)	Porcino ibérico (CC66)
CEF-XNL	Rissen	R11	Porcino blanco (P63)
CTX-CFQ	Typhimurium	104b (TY09)	Porcino blanco (P09, P22, P23, P27)
NAL-CIP	Typhimurium	U302 (TY13)	Porcino blanco (P19)
XNL-CTX-CFQ-NAL-CIP	Typhimurium	DT104b (TY09)	Porcino blanco (P21)
XNL-CTX-CFQ	Typhimurium	NT (TY09)	Porcino blanco (P24, P26)
CTX-CFQ-CIP	Typhimurium	DT104b (TY09)	Porcino blanco (P25)
CFQ	Typhimurium	DT104b (TY09)	Porcino blanco (P29)
CTX-CAZ-CFQ	Typhimurium	DT104b (TY09)	Porcino blanco (P30)
NAL-ENR-CIP	Typhimurium	U302 (TY43)	Perdiz (C19)
NAL-ENR	Typhimurium	U302 (TY13)	Porcino blanco (C49)
NAL	Typhimurium	U302 (TY13)	Porcino blanco (C50)
XNL-CTX-CFQ-NAL-ENR-CIP	Typhimurium	DT193, DT204a (TY48)	Perdiz (C54, C56)
CTX	Typhimurium	DT193 (TY67)	Porcino ibérico (CP67)

La alta prevalencia de cepas pentarresistentes en la cabaña ganadera porcina aumenta el riesgo de que un contagio a través de la cadena alimentaria limite el éxito de los tratamientos con antimicrobianos a los considerados como segunda barrera de contención quimioterápica, es decir, quinolonas y cefalosporinas (McDermott, 2006). Llegado ese extremo, las cepas que además incorporen resistencias a estos compuestos revisten la máxima peligrosidad (Tabla 5.4). Las bacterias *S. Typhimurium* que presentan la pentarresistencia

aumentan la probabilidad de fallecimiento del paciente hasta 4,8 veces en los dos años posteriores a la infección e incluso 10,3 veces cuando ese perfil de resistencia incluye a las quinolonas (Helms et al. 2004). Por otra parte, aunque la mayor resistencia a quinolonas se encuentra entre las cepas asociadas a la avicultura, proporcionalmente son más las infecciones septicémicas causadas por el serovar Typhimurium, de manera que el control de las antibiorresistencias en el ganado porcino es crucial para disminuir la letalidad de la salmonelosis (Crump et al. 2011).

La asociación de la pentarresistencia con el fagotipo *S. Typhimurium* DT104 (y posteriormente su variante DT104b) está descrita desde el principio de su dispersión desde Occidente (Glynn et al. 1999; Threlfall, 2000). De manera paulatina se han ido incorporando a su perfil de resistencia otros antimicrobianos como trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol, kanamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina y cefalosporinas de amplio espectro, además de colonizar nuevos hospedadores como aves, porcino, ovino y las más diversas especies de fauna silvestre (Hudson et al. 2000; McDermott, 2006).

Aunque está descrita la asociación de la pentarresistencia a diversos fagotipos, como U302 o DT193; en este trabajo, al igual que en el de Gebreyes et al. (2002), es mayoritario el DT104b (de la Torre et al. 2003; Hopkins et al. 2011). El perfil AMP-KAN-STR-SUL-TET, predominante según este autor en DT193, tan sólo aparece en cuatro de nuestras cepas frente a siete aislados de esta estirpe que presentan la pentarresistencia clásica. En cualquier caso, y a pesar de tratarse de un perfil de resistencia más propio de América, sí que está representado en nuestro cepario incorporando además en todos los casos al menos una resistencia a una cefalosporina y/o quinolona: en *S. Bredeney* (cepa P06); *S. Rissen* (cepas P31, P48, P49, P64, P65); *S. Typhimurium* DT104b (cepa P50) y *S. Typhimurium* NT (cepa SAV12) (Alcaine et al. 2007).

La tetrarresistencia AMP-STR-SUL-TET, normalmente acompañada de más antimicrobianos, típica de *S. Typhimurium* (mono y bifásica) DT193 según los estudios de Hopkins (2011) y Gebreyes (2002), es mayoritaria entre las cepas *S. 4,5,12:i:-* U311 (diez cepas para tres pulsotipos) mientras todas las cepas *S. 4,5,12:i:-* DT193 del pulsotipo MO1

presentan únicamente el perfil STR-GEN-SPT-CHL-SUL-TMP-SXT-TET sumando dos antibióticos de manera puntual. Este extenso perfil de antibiorresistencia sin beta-lactámicos también se detecta en aislados de *S. Choleraesuis* (cepa MP34) y *S. Derby* (cepa CC65). Esta última cepa se trata de la única de dicho serotipo aislada de un caso clínico mientras que el resto de los aislados no son multirresistentes o bien incorporan resistencia a beta-lactámicos excepto tres casos (cepas CP23, MP35 y MP14) que presentan el perfil STR-SPT-SUL-TET, ya descrito para este serotipo por otros autores (Vidal, 2005) y que aquí ha sido encontrado también en *S. Typhimurium* DT40 (cepa CP44).

La disparidad de perfiles de resistencia de las distintas cepas encuadradas en el mismo pulsotipo se podría deber, en general, a la mayor presión selectiva ejercida por la utilización de ciertos antimicrobianos en función del tipo de explotación. En ese sentido, en *S. Rissen* y *S. Hadar* se observa cómo la multirresistencia está asociada a los aislados de cerdo blanco pero no de ibérico, aunque también se puede argumentar, al igual que para *S. Enteritidis*, que esta diversidad se debería más a las limitaciones de discriminación mediante PFGE que a la disparidad de pautas sanitarias (Bakeri, 2003; Landeras, 1996; Valdezate et al. 2007).

5.2.5. Actividad β -lactamasa.

La reacción colorimétrica del nitrocefín en contacto con las colonias de *Salmonella enterica* se ha mostrado una técnica eficaz para evidenciar la producción de beta-lactamasas por parte de las bacterias. Sin embargo, al no poderse determinar con precisión, no tiene sentido establecer un gradiente de actividad tan sólo con el examen visual de la reacción del nitrocefín en la placa. Se hacen necesarios, por tanto, los ensayos espectrofotométricos para establecer en qué grado presentan las salmonelas dicha actividad enzimática.

Campos (2011), en su estudio de tesis doctoral desarrollado sobre cepas de *Salmonella enterica* aisladas de casos clínicos humanos, obtiene datos de actividad enzimática muy similares a los derivados de este trabajo, con una media de 354 mU/mg para la enzima TEM y 192 mU/mg para OXA. Además, la actividad beta-lactamasa correlaciona con la CMI de la

cefalotina (cefalosporina de primera generación de prescripción exclusivamente médica) y de la cefquinoma (de cuarta generación y uso únicamente veterinario).

Originalmente las beta-lactamasas de clase A (como las de tipo TEM) tan sólo conferían resistencia a unas pocas cefalosporinas (Ambler, 1980). A lo largo de la década de los noventa los genes *bla* que codifican estas proteínas comenzaron una evolución vertiginosa que permitió aumentar su rango de acción. Se pasó de hablar sobre penicilinasas de amplio espectro, con cierta actividad frente a cefalosporinas de primera generación como la cefalotina (TEM-1 y TEM-2; clasificadas en el grupo funcional 2b) a beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE; clasificadas en el grupo funcional 2be; Bush et al. 1995a), tales como TEM-3, TEM-4, TEM-20, TEM-27, TEM-52, TEM-63, TEM-131. Estas últimas son activas frente a cefalosporinas de amplio espectro como el ceftiofur o la cefquinoma. En nuestro estudio, la total inhibición de las enzimas TEM por parte del clavulanato descarta que pudiera tratarse de proteínas encuadradas en el grupo funcional 2br, como las variantes de la TEM-30 a la TEM-36 (Alcaine et al. 2007; Cantón, 2007; Michael et al. 2006).

Los ensayos realizados por Chen et al. (1992) para medir la actividad de distintas beta-lactamasas producidas por enterobacterias frente a cefquinoma y ceftazidima demostraron la menor hidrólisis relativa de TEM-5 y TEM-9 (en ese orden) frente a cefquinoma (20 y 45%) que frente a ceftazidima (55 y 60%) mientras que TEM-3 afectaría en mayor medida al primero (5%). Por otro lado, OXA-2 no mostró actividad frente a ninguno de los dos antimicrobianos (<0,1%).

Deshpande et al. (2000) estableció, midiendo la CMI, que la enzima TEM-4 era la de mayor actividad beta-lactamasa contra ceftiofur y ceftriaxone (cefalosporina de elección en el tratamiento de niños) y tenía un efecto moderado frente a cefquinoma. Entre las doce enzimas de tipo TEM ensayadas cinco mostraron más (TEM-7) o idéntica actividad (TEM-9, TEM-10, TEM-12 y TEM-26) frente a cefquinoma que ceftiofur; y el resto mayor actividad frente a ceftiofur (TEM-1b, TEM-2b, TEM-3, TEM-4, TEM-5, TEM-6-, TEM-8). También se ha demostrado que las delecciones de aminoácidos en TEM-1 no sólo no tienen por qué restar actividad beta-lactamasa sino que incluso pueden aumentar su resistencia a cefalosporinas de

amplio espectro como la ceftazidima (Simm et al. 2007). La resistencia a ceftiofur y ceftriaxone está correlacionada, no así la de ceftiofur con cefquinoma, lo cual encaja con nuestros datos pues sería OXA la enzima que mostrase actividad específica frente a cefquinoma y cefotaxima mientras que TEM fue más activa frente a ceftiofur, cefalotina y ceftazidima. Esto no deja de ser paradójico habida cuenta de tratarse OXA de una beta-lactamasa de clase D, sin actividad frente a cefalosporinas (Bush et al. 1995; Deshpande et al. 2000). Recientemente se ha descubierto en Argentina la primera beta-lactamasa de clase D con actividad específica frente a cefalosporinas de espectro extendido (ceftazidima y cefotaxima) y carbapenemas: OXA-163 que difiere de OXA-48 en una sustitución amino y cuatro deleciones de aminoácidos (Poirel et al. 2011).

5.3. Genotipos de resistencia.

5.3.1. Integrones.

Los integrones de tipo 1 son los más habituales en *Salmonella enterica* y en la mayor parte de los estudios son los únicos descritos (Douris et al. 2007; Geyebres et al. 2002; McDermott, 2006; Rodríguez et al. 2008). Estos elementos génicos están asociados con la multiresistencia, si bien se encuentran también distribuidos entre cepas con resistencia a menos de cuatro antimicrobianos e incluso totalmente sensibles; aunque la frecuencia es mucho menor (Randall et al. 2004; Rodríguez et al. 2008; Vo et al. 2006). Por término general, a mayor tamaño de las casetes mayor multiresistencia pues su dimensión varía en función del número de genes que conllevan: de cero a cuatro (Baquero, 2007; McDermott, 2006; Rodriguez et al. 2008).

No siempre que se detecta el integrón de tipo 1 mediante amplificación del gen de la integrasa (*int1*) tienen por qué amplificarse las casetes a partir de sus regiones conservadas 3' y 5'. Como ya se comentó en el capítulo de resultados, no se amplificó ninguna casete en 24 cepas positivas a *int1* (30,8% del total). Según Vo et al. (2006), la región 3' de la casete del integrón de tipo 1 no está siempre conservada, y estos cambios serían los responsables de la no amplificación de las casetes de genes. Este autor, mediante PCR inversa, consiguió resolver este escollo en una de las cuatro cepas de salmonelas sin casete (11% de las *int1* positivas) pero no así en las serotipadas como Infantis, Livingstone y Mbandaka. Otros

autores presentan tasas de no amplificación superiores, como 31,4% (Rayamajahi et al. 2008) y 37,5% (San Martín et al. 2008), en aislados procedentes de origen porcino; o 19,5%, a partir de aislados clínicos humanos (Rodríguez et al. 2008). En este último estudio, esta circunstancia se dio únicamente entre cepas de *S. Typhimurium* (50%) y especialmente *S. 4,5,12:i:-* (72,7%). Lo cual no deja de ser paradójico pues son precisamente los serotipos asociados al cerdo los que presentan con mayor frecuencia integrones de tipo 1 y mayores tasas de amplificación: *S. Typhimurium* mono y bifásica, *S. Derby*, *S. Rissen*, *S. Bredeney*, *S. Anatum* y sobre todo *S. Brandenburg*. Por otro lado, nunca se había detectado antes un integrón de clase 1 en *S. Hindmarsh* (Martínez et al. 2007; Rodríguez et al. 2008; San Martín et al. 2008; Vo et al, 2006).

Entre las cepas de nuestra colección con *int1* pero sin casete amplificada encontramos cuatro procedentes del cerdo ibérico no multirresistentes (Mikawasima, Rissen, Intabul y Typhimurium DT204c) así como la tercera parte de las cepas *S. Typhimurium* DT193 también procedentes de este tronco racial (Tabla 4.12). Estos integrones sin casetes se podrían deber a una menor presión antibiótica sobre la micropoblación de esta cabaña ganadera no dando pie a que estas estructuras acumulen determinantes de resistencia, a pesar de su manifiesta capacidad para ello lo que ha conducido a su denominación como "módulos de coselección" (Baquero, 2007; Carattoli, 2007; Gebreyes et al. 2002; Randall et al. 2004; Rodríguez et al. 2008; Vo et al. 2006).

La amplificación de varios casetes puede significar bien la existencia de varios integrones de tipo 1 bien la complementariedad de varios casetes en el mismo integrón, este sería el caso de las casetes de 1.0 y 1.2 kb de la SGI1 típicamente asociadas a *S. Typhimurium* DT104, DT104b y U302 y responsable de la pentarresistencia ACSSuT (Figura 5.1).

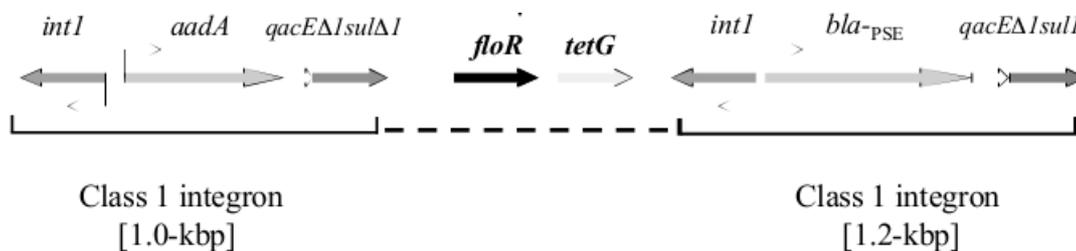


Figura 5.2. Integrones de tipo 1 en una disposición clásica de la SGI1 (Quinn, 2006).

Se han identificado más de 70 casetes distintas en *S. enterica* con genes que confieren resistencia a beta-lactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim, cloranfenicol y cefalosporinas. No obstante y desde nuestro conocimiento, los resultados de este trabajo podrían suponer la primera descripción de los genes *dhfr*VII en *S. Montevideo*, *dfr*A12 en *S. Rissen*, *S. 4,5,12:i:-* en *S. Brandenburg* y *dfr*A1 en *S. Hindmarsh* (Gebreyes et al. 2002; McDermott, 2006; NCBI nucleotide library, 5ene2011).

Pero no todas las cepas que contienen éstos u otros genes han mostrado resistencia fenotípica, lo cual se podría deber a la existencia de mecanismos represores o defectos genotípicos como la no inclusión del promotor en la casete. De hecho, está descrita la existencia de la SGI1, o alguna de sus variantes, sin que se dé un perfil de pentarresistencia sino otros de menor entidad como AMP-STR-SUL-TET o incluso SUL-TET. También pudiera ser necesaria su movilización mediante plásmidos, puesto que aunque se ha evidenciado la movilización horizontal de la SGI1, esto no suele ser lo más habitual. Por otro lado se observan evidencias de movilización en los determinantes asociados al perfil G, ya que un mismo tipo de integrón se detecta en dos cepas con dos perfiles fenotípicos muy distintos debido, probablemente, a la ausencia en la cepa MP01 (de cerdo ibérico) del determinante *bla*_{TEM} normalmente asociado a plásmidos y que confiere resistencia a beta-lactámicos (Gebreyes et al. 2002; Michael et al. 2006; Quinn, 2006, Vo et al. 2006). De hecho, en la tabla 4.12 se observa una alta heterogeneidad de perfiles de resistencia así como una gran diversidad en las combinaciones fenotipo-genotipo: mismo perfil de antibiorresistencia sin compartir mismo perfil genotípico y viceversa. Y, pese a no tratarse de la situación más habitual, parece ser un fenómeno que va en aumento (Baquero, 2008; Rodríguez et al. 2008).

En relación a la **dispersión de los integrones** por transferencia horizontal o por diseminación clonal, vemos que dependiendo del tipo de perfil se puede dar presumiblemente una opción, la otra o bien una combinación de ambas (Glenn et al. 2011). Los integrones de tipo A, B, F y J son básicamente de **dispersión clonal**. En los tres primeros casos se trata de pulsotipos/clones de *S. Typhimurium*. El integrón de perfil A se encuentra mayoritariamente en cepas del fagotipo DT104b, por lo que se puede asumir su transmisión vertical en la

población de cepas más frecuente en cerdo blanco (n=13).

El origen del integrón con casete de tipo B parece asociado a aves de caza y compañía (codorniz, perdiz y canario), de donde pudiera haberse transmitido al cerdo blanco puesto que, aunque se encuentra en aislados con distintos fagotipos y pulsotipos, se trata de cepas muy cercanas filogenéticamente (Tabla 4.4). Con integrones del perfil F tan sólo hay tres casos, que se corresponden con un pulsotipo aislado tanto de cerdo blanco como de perdiz. Y por último, con el integrón de perfil J se presentan dos cepas de *S. Derby* con distinto pulsotipo pero relacionadas genéticamente.

En cualquiera de estos perfiles no se dispone de evidencias que permitan sugerir una vía predominante de **transmisión**. Éste sí sería el caso de los perfiles C, D, E, G e I, para los que se han detectado los mismos elementos distribuidos entre diversas serovariedades aisladas también de diversas especies animales (Tabla 4.12), lo que claramente sugiere su transmisión horizontal. Según Fernando Baquero (2008), son más probables los fenómenos de transferencia horizontal que la convergencia evolutiva lo cual apoyaría la hipótesis de la gran trascendencia de la transmisión, tanto horizontal como clonal, para la dispersión de las antibiorresistencias.

Los clones con amplia distribución son aislados casi siempre de la misma especie animal. Por ejemplo *S. Rissen* RI1 (perfil C) o *S. Brandenburg* BA2 del cerdo blanco mientras que *S. Hindmarsh* HI1 (para el perfil D) está asociado al cerdo ibérico. Las cepas aisladas de cerdo blanco e ibérico no comparten normalmente integrones ni siquiera en aquellos de transferencia horizontal, una evidencia más de la separación de las micropoblaciones de ambos troncos raciales como ya se comentó en el apartado 4.1.

5.3.2. Determinantes de cefalosporinas

Se considera que las beta-lactamasas son mecanismos desarrollados por los mismos microorganismos que producen su sustrato -los beta-lactámicos- como medida de autodefensa y así evitar que lo que pudiera darles una ventaja evolutiva se acabara convirtiendo en su autodestrucción, de manera que ambos compuestos, antagonistas, se autorregulan (Medeiros,

1997). La extensión en el uso de los beta-lactámicos fuera de su nicho biológico por la mano del hombre aceleró la evolución de las beta-lactamasas, convirtiéndose con el tiempo en el principal mecanismo de resistencia a los antimicrobianos beta-lactámicos (Cantón, 2008). Las primeras beta-lactamasas descritas, TEM y SHV (ambas de clase molecular A), tenían como sustrato únicamente aminopenicilinas. Al coincidir en su descubrimiento con la introducción de las cefalosporinas de primera generación, pronto (durante los años 1960-70) se evidenció también su actividad sobre éstas. Ambas beta-lactamasas de amplio espectro están codificadas por genes asociados a plásmidos (*bla*). Por otro lado las enzimas de tipo PSE (también de clase A) y OXA (clase D) no han desarrollado variantes con actividad frente a cefalosporinas (la primera) o lo han hecho recientemente (la segunda), estando asociadas a elementos cromosómicos aunque en algún caso mobilizables, como serían la SGI1 y/o casetes génicas asociadas a integrones (Mulvey et al. 2004; Poirel et al. 2010).

La introducción de inhibidores frente a estas enzimas (clavulanato, sulbactam, tazobactam) en los tratamientos con beta-lactámicos solventó el problema en la década de los ochenta, pero sólo parcialmente pues no todas las enzimas se ven inhibidas de igual manera por ellos (Bush et al. 1995b). El problema definitivo fue la aparición en esta década de las cefalosporinasas, bien específicas (como CMY, de clase C) bien por nuevas ampliaciones del sustrato de las beta-lactamasas antiguas (TEM y SHV, que pasan a ser de espectro extendido o BLEEs) o la recién descubierta CTX-M. Tanto *bla*_{CMY} como *bla*_{CTX-M} están asociadas a plásmidos, pero mientras la primera presenta una mayor prevalencia en EEUU desde la década de los noventa, la segunda se ha convertido en epidémica en Europa durante este mismo periodo (Arlet, 2006; Cantón, 2010; Li, 2007). En esta última década se comienzan a utilizar las carbapenemas, nuevos beta-lactámicos ante los que no se conocía resistencia hasta que aparecieron las metallo-lactamasas, de la clase molecular B, con actividad frente a todas las beta-lactamasas aunque todavía no han sido descritas en *Salmonella enterica* (Walsh, 2007; Zhao et al. 2009).

Los genes que codifican las enzimas de tipo PSE, OXA y TEM detectados en este estudio no sirven por sí solos para explicar la resistencia a las cefalosporinas, habida cuenta de su escasa (o nula) actividad cefalosporinasa. Este hecho está en sintonía con los valores de

CMI relativamente bajos de resistencia frente a las cefalosporinas encontrados sobre todo en las cepas con *bla*_{PSE}, que está asociado al perfil B del integrón de tipo 1. Por otro lado, parece probable la participación de bombas MDR, que contribuirían a esta disminución de la sensibilidad a cefalosporinas, puesto que prácticamente todos los aislados que la presentaron tenían perfil de multirresistencia (Chen, 2007; Greko et al. 2009; Li, 2007).

Aunque está descrita la existencia de varios determinantes de resistencia a beta-lactámicos en la misma bacteria, lo que implica mayores valores de CMI para dichos compuestos, no es lo más habitual y en cualquier caso restaría eficiencia adaptativa al microorganismo en cuestión (Andersson y Hughes, 2007; Cantón, 2008; Zhao et al. 2009). Por otro lado, la asociación de los perfiles de casete D, E, F, G, H e I con *bla*_{TEM} plantea la posible existencia de plásmidos que determinen resistencias además de a beta-lactámicos a otros antimicrobianos como trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglicósidos o tetraciclinas (Carattoli, 2008; Gebreyes et al. 2002).

A pesar de la prohibición europea de la utilización de cefalosporinas de amplio espectro en avicultura se está asistiendo a una pérdida de la sensibilidad frente a estos compuestos asociada a la dispersión de determinantes de resistencia de gran trascendencia en salud pública como son las cefalosporinas CTX-M (Blanc, 2007; Diericks et al. 2010; García-Fernández et al. 2007; Greko et al. 2009; Herrera-León et al. 2010). Además, son frecuentes los fenómenos de coresistencia a beta-lactamasas y quinolonas, bien por mecanismos desconocidos o no relacionados, bien por un fenómeno de selección modular, es decir compartiendo quinolonas y cefalosporinas determinantes de resistencia más allá de los genes como pudieran ser las casetes, los integrones, los transposones o los plásmidos, que confieren a la bacteria que los porta una ventaja evolutiva en determinadas microbiocenosis (Baquero, 2008; Li, 2007; Whichard et al. 2007).

La primera descripción de BLEEs en salmonelas procedentes de animales en España se la debemos al equipo de Carmen Torres (Riaño et al. 2006). En un amplio chequeo sobre aislados procedentes de animales de abasto de la Red Española de Vigilancia a los Antimicrobianos Veterinarios (VAV), detectaron los genes que codifican las enzimas CTX-M

y TEM en dos cepas aisladas de aves (*S. Virchow* y *S. Enteritidis*). Ambos genes estaban ubicados en un integrón de tipo 1 y, además, detectaron los determinantes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} en otra cepa, *S. Rissen* procedente de cerdo en este caso. El mismo equipo había descrito anteriormente la amplia distribución de *bla*_{TEM} entre los aislados españoles de *Escherichia coli* a partir de animales, alimentos y personas, por encima de otros genes que codifican BLEEs como *bla*_{SHV} o *bla*_{OXA} (Briñas et al. 2002).

Tabla 5.5. Resumen de las cepas analizadas en este trabajo que presentan nuevas combinaciones de características genotípicas y fenotípicas hasta donde llega nuestro conocimiento (NCBI nucleotide library, Sene2011).

Cepas	Serovar y fagotipo	Determinantes	Especie
MP42 y MP43	Hindmarsh	<i>bla</i> _{TEM} + <i>int1</i> (perfil D)	Cerdo ibérico
P51	Anatum	<i>bla</i> _{TEM} + <i>int1</i> (E)	Cerdo blanco
P6	Bredeney	<i>bla</i> _{TEM} + <i>int1</i> (E)	Cerdo blanco
P48	Rissen	<i>bla</i> _{TEM} + <i>int1</i> (I)	Cerdo blanco
P35, P36, P38 y P39	Brandenburg	<i>bla</i> _{TEM} + <i>int1</i> (D) <i>parC</i> (T57S)	Cerdo blanco
P12	4,5,12:i- U302	<i>bla</i> _{TEM} + <i>int1</i> (C)	Cerdo blanco
P57	Typhimurium DT29	<i>bla</i> _{TEM} + <i>int1</i> (F) <i>gyrA</i> (S83Y)	Cerdo blanco

5.3.3. Determinantes de quinolonas.

Las mutaciones en *gyrA* son uno de los principales mecanismos de resistencia -en algunos casos el primero de varios- al ácido nalidíxico e influyen en la pérdida de sensibilidad a las fluoroquinolonas (Fábrega et al. 2009). Las variantes alélicas de serina en el codon 83 (S83Y y S83F, en nuestro caso) confieren mayor pérdida de sensibilidad a las fluoroquinolonas (MIC= \geq 1 mg/L) y al ácido nalidíxico (Liébana et al. 2002). Sin embargo, la existencia de una mutación en *gyrA* no tiene por qué implicar resistencia fenotípica a ácido nalidíxico ni las mutaciones en *parC* suelen determinar por sí solas la resistencia, necesitando el concurso de otro mecanismo para tener efecto. En este trabajo se ha comprobado cómo la mutación T57S aumenta significativamente la pérdida de sensibilidad frente a la enrofloxacin y al ácido nalidíxico, contribuyendo, así mismo, a un incremento de la resistencia debida a D87N (Fabrega et al. 2008; Vila et al. 1996, 2007).

La alta frecuencia de presentación de D87Y entre las cepas de origen animal de este estudio no tiene una correspondencia exacta en trabajos de otros autores que, pese a trabajar sobre ceparios de idéntica procedencia, obtienen resultados similares a los de origen humano (Liébana et al. 2002; Ling et al. 2003; Eaves et al. 2004; Hopkins et al. 2007). Sin embargo, en un trabajo previo sobre salmonelas aisladas de cerdo, Seminati et al. (2004), se obtuvieron frecuencias del 50% para la mutación D87Y del serotipo Typhimurium, y en menor medida en Hadar, Tilgurg y 4,5,12:i:-; siguiéndole en importancia S83F (*S. Virchow*, habitual de avicultura) y otras variantes alélicas (hasta siete) entre las que se encuentra también la S83Y (en *S. Anatum*). En el caso de este trabajo, la mutación D87Y se ha detectado sobre todo en aislados procedentes de avicultura (excepto un caso de cerdo ibérico y serotipo Essen) serotipados como Enteritidis, Hadar, Infantis y Othomarschen. Liébana et al. (2002) encuentran la mayor parte de las variantes S83Y en la serovariedad asociada a aves Newport mientras que hasta un 23% de alelos S83F se encontraron entre los aislados de *S. Typhimurium* y tan sólo cuatro presentaron D87Y (de un total de 100 secuencias con variantes alélicas). Un estudio más reciente en un hospital español asocia D87Y con *S. Enteritidis* y, en menor medida, S83F con este mismo serotipo mientras que D87N lo estaría con *S. Hadar* (Lunn et al. 2010).

La baja frecuencia con la que se producen las mutaciones en relación a la división celular (10^{-8} a 10^{-9})² junto a la localización cromosómica de los determinantes de resistencia determinados por mutaciones en las QRDR convierten a la dispersión clonal en el elemento de primer orden para la diseminación de las resistencias a quinolonas (Baquero, 2008; Quinn, 2006).

El único QRDR de *gyrA* correspondiente a S83F detectado en este trabajo procede de una cepa de *S. Enteritidis* aislada de cigüeña blanca relacionada genética y fenotípicamente con un pulsotipo altamente prevalente en Extremadura. En un trabajo de nuestro equipo pendiente de revisión se plantea la posibilidad de que ciertas especies silvestres como la cigüeña blanca, en virtud de su hábitat semiacuático altamente antropomorfizado, pudieran servir como eslabón intermedio para la reincorporación de salmonelas resistentes a los

2 Sobre todo si se compara con otros eventos relacionados con la generación y dispersión de resistencias como la transposición (10^{-4} a 10^{-8}), duplicación de genes (10^{-4} a 10^{-5}), integración en elementos génicos (10^{-3} a 10^{-5}), transferencia plasmídica (10^{-2} a 10^{-6}), o recombinación por conjugación (10^{-1} a 10^{-2}) (Baquero, 2008).

antimicrobianos de uso intensivo en medicina humana a los animales de abasto, con el consiguiente riesgo para la salud pública (Campos, 2011; Palomo et al. 2011).

Aunque la detección de mutaciones en las QRDR de *gyrA* podría explicar la mayor parte de los fenotipos de resistencia a quinolonas de nuestro cepario no se debe obviar la importancia de otros mecanismos cromosómicos como la bomba de eflujo AcrAB -no ensayada en nuestro trabajo- relacionada con la multirresistencia y la pérdida de sensibilidad a todo tipo de quinolonas (Fábrega et al. 2009; Quinn, 2006; Vila, 2007). Esta bomba no sólo está relacionada con la resistencia al ácido nalidíxico y a las fluoroquinolonas sino que también muestra sinergia con la bomba de eflujo propia de las tetraciclinas y los fenicoles ubicada en la SGI1 de *S. Typhimurium* DT104 (Baucheron et al. 2004).

Más controvertido es el papel de las PMQR (Qnr, QepA y Aac(6')-Ib-cr) en la resistencia a las quinolonas. Desde el descubrimiento del primer gen *qnr* de *Klebsiella pneumoniae* en 1998, las descripciones de éste y otros elementos relacionados en nuevas bacterias, hospedadores y países no dejan de aumentar, bien asociados a la llamada "resistencia no clásica" (cuando afecta a fluoroquinolonas pero no a ácido nalidíxico), bien en relación a un aparente estado latente sin apenas (o ninguna) incidencia en la sensibilidad a estos antimicrobianos (Campos, 2011; Gunnel et al. 2009; Herrera et al. 2010; Lunn et al. 2010; Martínez-Martínez et al. 1998). En cualquier caso, y a pesar de la ausencia de estos determinantes en nuestro cepario así como la existencia de pocas descripciones de algún *qnr* en salmonelas de origen animal, la gran importancia relativa de la transmisión plasmídica para la dispersión de las antibiorresistencias nos obliga monitorizar el desarrollo de este tipo de determinantes de resistencia en nuestras cabañas ganaderas (Baquero, 2008; Carattoli, 2008; San Martín et al. 2008; Sjölund-Karlsson et al. 2010a; Veldman et al. 2011).

6. Conclusiones

1. La resistencia frente a las quinolonas prevalece especialmente entre las cepas de *S. enterica* aisladas de avicultura, mientras que las procedentes de ganado porcino, mayoritariamente del serotipo Typhimurium, presentan una elevada frecuencia en la comúnmente denominada pentarresistencia (AMP-CHL-STR-SUL-TET), a la que se suman en determinados aislados una baja sensibilidad frente a las cefalosporinas y las quinolonas.
2. Los principales determinantes de resistencia frente a los antimicrobianos clásicos de la medicina veterinaria son los integrones de tipo 1.
3. Los integrones de tipo 1 detectados en este trabajo muestran una gran diversidad de casetes génicas asociadas, que contienen los genes *bla*_{OXA-30}, *bla*_{PSE-1}; *aadA1*, *aadA2*, *aadA5* y *aadA12*; *dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA17* y *dhfrVII*; y también una amplia dispersión entre los serotipos y los hospedadores estudiados en este trabajo, sobre todo en cerdo, tanto blanco como ibérico; si bien de los detectados en este último tronco racial predominaron aquéllos en los que no se pudieron identificar sus casetes.
4. Las beta-lactamasas OXA y TEM constituyen el principal mecanismo de resistencia frente a los beta-lactámicos entre las cepas de origen animal, pudiendo estar relacionados, en asociación con otros mecanismos de resistencia, con la pérdida de sensibilidad a las cefalosporinas.
5. No se han detectado cefalosporinasas de localización plasmídica, tales como CMY y CTX-M, pese a que, en otros ámbitos geográficos, está aumentando su prevalencia entre las enterobacterias de origen hospitalario, comunitario y animal.
6. Cuatro variantes alélicas de GyrA: D87Y, D87N, S83F y S83Y explican por sí mismas o en conjunción con otros mecanismos (por ejemplo la mutación T57S de *parC*) la menor eficacia de las quinolonas en la mayoría de las cepas resistentes. Sin embargo, no todas influyen del mismo modo sobre la resistencia al ácido nalidíxico o las

fluoroquinolonas, destacando S83Y por su efecto sobre el fenotipo de las cepas.

7. La resistencia de los aislados de *Salmonella enterica* frente a los antimicrobianos, tanto a nivel fenotípico como genotípico, está condicionada por el trinomio: sistema de manejo, especie animal y serovariedad-fagotipo.

8. Existen mecanismos eficientes para la dispersión vertical y horizontal de nuevos genotipos de *Salmonella enterica* entre los animales, lo que justifica el establecimiento de medidas de vigilancia que permitan controlar la circulación de los determinantes de resistencia con los que estos microorganismos responden a las terapias y pautas de manejo, resultado de las políticas sanitarias y de los nuevos procesos productivos.

7. Perspectivas

Los resultados obtenidos gracias a este trabajo de investigación nos animan a continuar profundizando en el estudio de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos de *Salmonella enterica*. En ese sentido, sería interesante abordar cuestiones no tan centradas en el *qué* sino en el *cómo* y, de ser posible, el *por qué*. De manera que podamos discernir, por ejemplo, ¿mutación o recombinación? ¿Transferencia horizontal o dispersión clonal? A corto plazo se debería abordar los perfiles plasmídicos más prevalentes, pero sobre todo la plasticidad génica de la SGI1 y de los integrones habida cuenta del peculiar comportamiento de los integrones de tipo 1 detectados en *S. enterica* serotipo Typhimurium fagotipo DT193 aislados de cerdo ibérico. Las posibilidades que ofrece estudiar la evolución microbiana sobre un modelo vivo de un contexto ganadero y veterinario totalmente distinto al del resto de los hospedadores habituales de la infección nos parece tremendamente sugerente.

Así mismo, la trascendencia de la fauna silvestre para la salud pública y la sanidad animal nos animan a continuar con el chequeo y estudio de los determinantes de resistencia asociados a sus enterobacterias para intentar comprender no sólo su papel como reservorio infeccioso y de resistencias a los antimicrobianos sino también como indicador biológico de la contaminación ambiental por productos medicamentosos o microorganismos resistentes a los mismos.

A la hora de establecer planes de control de las principales toxiinfecciones alimentarias de origen animal no sólo se han de valorar las estirpes de mayor trascendencia clínica o epidemiológica sino también el sistema de manejo de la explotación en particular por la relevancia que éste implica para el nivel de antibiorresistencia (Aarestrup, 2006). Si bien los datos de nuestro estudio son parciales al respecto, por no estar representadas todas las variables de manejo de todas las especies, los datos analizados y la bibliografía consultada vienen a confirmar que a mayor intensificación tanto mayor antibiorresistencia como menor biodiversidad; prevaleciendo las bacterias con mayor trascendencia clínica, no sólo en cuanto a su epidemiología (por un sesgo claro: son los animales de régimen intensivo de cría quienes alimentan a los europeos, norteamericanos y japoneses en mayor medida y por tanto de donde proceden la mayoría de las infecciones) sino incluso a su virulencia. Al fin y al

cabo, los procesos de coselección afectan especialmente a los factores de patogenicidad (Hacker, 2008). En este sentido, no deja de ser paradójico que, a pesar de la evidencia, se establezcan los mismos objetivos biosanitarios sean cuales sean las características de la explotación ganadera más allá del destino del producto final cuando esto pudiera ser, precisamente, un agravio comparativo para con las explotaciones menos intensificadas.

8. Bibliografía

- Aarestrup, F. M., H. Hasman, et al. (2010). "Evaluation of eight different cephalosporins for detection of cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*." Microb Drug Resist **16**(4): 253-261.
- Aarestrup, F. M. and S. M. Pires (2009). "Comment on: Causal regulations vs. political will: why human zoonotic infections increase despite precautionary bans on animal antibiotics." Environ Int **35**(4): 760-761.
- Aarestrup, F. (2006). Preface. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. F. Aarestrup. Washington DC, ASM Press: XI-XII.
- Aarestrup, F. M. and J. Engberg (2001). "Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*." Vet Res **32**(3-4): 311-321.
- Agustín, A. I., J. J. Carramiñana, et al. (2005). "Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. from pigs at slaughter in Spain in 1993 and 2001." Lett Appl Microbiol **41**(1): 39-44.
- Aiello, S. (2000). El Manual Merck de Veterinaria. Barcelona, Océano Grupo Editorial, SA.
- Ajiboye, R. M., O. D. Solberg, et al. (2009). "Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections." Clin Infect Dis **49**(3): 365-371.
- Akkina, J. E., A. T. Hogue, et al. (1999). "Epidemiologic aspects, control, and importance of multiple-drug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in the United States." J Am Vet Med Assoc **214**(6): 790-798.
- Alcaine, S. D., L. D. Warnick, et al. (2007). "Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*." J Food Prot **70**(3): 780-790.
- Alekshun, M. N. and S. B. Levy (2007). "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance." Cell **128**(6): 1037-1050.

- Alfredson, D. A. and V. Korolik (2007). "Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*." FEMS Microbiol Lett **277**(2): 123-132.
- Alley, M. R., J. H. Connolly, et al. (2002). "An epidemic of salmonellosis caused by *Salmonella* Typhimurium DT160 in wild birds and humans in New Zealand." N Z Vet J **50**(5): 170-176.
- Amar, C., C. Arnold, et al. (2008). "Real-Time PCRs and Fingerprinting Assays for the Detection and Characterization of Salmonella Genomic Island-1 Encoding Multidrug Resistance: Application to 445 European Isolates of *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Proteus*." Microb Drug Resist **14**(2): 79-92.
- Anderson, E. S., L. R. Ward, et al. (1977). "Bacteriophage typing designations of *Salmonella* Typhimurium." J Hygiene **78**(2): 297-300.
- Angulo, F., K. Johnson, et al. (2000). "Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal Salmonella: implications for the use of fluoroquinolones in food animals." Microb Drug Resist **6**(1): 77-83.
- Angulo, F. J., N. L. Baker, et al. (2004). "Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans." Semin Pediatr Infect Dis **15**(2): 78-85.
- Anjum, M. F., S. Choudhary, et al. (2011). "Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within Salmonella isolated from food animals in Great Britain." J Antimicrob Chemother **66**(3): 550-559.
- Archambault, M., P. Petrov, et al. (2006). "Molecular characterization and occurrence of extended-spectrum beta-lactamase resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Corvallis from Thailand, Bulgaria, and Denmark." Microb Drug Resist **12**(3): 192-198.
- Arlet, G., T. J. Barrett, et al. (2006). "Salmonella resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology." Microbes Infect **8**(7): 1945-1954.
- Arthur, T. M., N. Kalchayanand, et al. (2008). "Comparison of effects of antimicrobial interventions on multidrug-resistant *Salmonella*, susceptible *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7." J Food Prot **71**(11): 2177-2181.

- Asperilla, M. O., R. A. Smego Jr, et al. (1990). "Quinolone antibiotics in the treatment of salmonella infections." Reviews of Infectious Diseases **12**(5): 873-889.
- Astorga, R. J., A. E. Salaberria, et al. (2007). "Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Spain." J Food Prot **70**(6): 1502-1506.
- Altschul, S.F., W. Gish, et al. (1990) "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**: 403-410.
- Avsaroglu, M. D., R. Helmuth, et al. (2007). "Plasmid-mediated quinolone resistance conferred by qnrS1 in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin." J Antimicrob Chemother **60**(5): 1146-1150.
- Bager, F. and R. Helmuth (2001). "Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*." Veterinary Research **32**(3-4): 285-290.
- Baggesen, D. L., D. Sandvang, et al. (2000). "Characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States." J Clin Microbiol **38**(4): 1581-1586.
- Bailey, J. S. and D. E. Cosby (2005). "Salmonella prevalence in free-range and certified organic chickens." J Food Prot **68**(11): 2451-2453.
- Bakeri, S.A., R.M. Yasin, et al. (2003). "Genetic diversity of human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Malaysia." J Appl Microbiol **95**:773-780.
- Baquer, N., E. J. Threlfall, et al. (1994). "Phage type 193 of *Salmonella typhimurium* contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles." FEMS Microbiol Lett **115**(2-3): 291-295.
- Baquero, F. (2008). Modularization and Evolvability in Antibiotic Resistance. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. F. Baquero, C. Nombela et al. Washington, DC, ASM Press: 233-248.
- Baquero, F. (2010). La crisis actual. Resistencia a los antimicrobianos. I. d. S. C. I. (ISCIII). Madrid.

- Barlow, R. S., J. M. Pemberton, et al. (2004). "Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection." Antimicrob Agents Chemother **48**(3): 838-842.
- Barrow, P., M. Jones, et al. (2010). Salmonella. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. C. Gyles, J. Prescott, J. Songer et al. Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing: 231-266.
- Batchelor, M., K. Hopkins, et al. (2008). "Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria." Int J Antimicrob Agents **31**(5): 440-451.
- Bell, R. L., N. Gonzalez-Escalona, et al. (2011). "Phylogenetic evaluation of the 'Typhimurium' complex of Salmonella strains using a seven-gene multi-locus sequence analysis." Infect Genet Evol **11**(1): 83-91.
- Bhat, K., A. Andrade, et al. (1998). "Antimicrobial susceptibility of Salmonella typhi to quinolones & cephalosporins." Indian J Med Res **107**: 247-251.
- Biedenbach, D., M. Toleman, et al. (2006). "Analysis of Salmonella spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004)." Diagn Microbiol Infect Dis **54**(1): 13-21.
- Bin Kim, H., C. H. Park, et al. (2009). "Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants over a 9-Year Period." Antimicrob Agents Chemother **53**(2): 639-645.
- Blanc, V. (2007). Caracterización de cepas y de plásmidos de "Enterobacteriaceae" portadores de beta-lactamasas de espectro extendido. PhD, Autónoma de Barcelona.
- Blanco, M., F. Morán, et al. (2006). Resistencia bacteriana. Valoración de antibacterianos. Manual de Microbiología Veterinaria para Estudiantes de Veterinaria. S. Vadillo, S. Píriz et al. Madrid, Universidad de Extremadura-Librería Técnica Figueroa: 133-145.
- Borge, C., J.M. Márquez del Cid, et al. (2010). "Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes isolates from Iberian pigs reared in extensive farms in Southwest

- Spain.” 13th International Symposium Salmonella and Salmonellosis. Saint-Malo, France.
- Borsoi, A. (2009). Inoculação "Salmonella" Heidelberg e "Salmonella" Enteritidis em pintos de corte para a avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de "Salmonella" Enteritidis. PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem. **72**: 248-254
- Brenner, F., G. Villar, et al. (2000). "Salmonella" nomenclature. J. Clin. Micro. **38**: 2465-2467.
- Brinas, L., M. Zarazaga, et al. (2002). "Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals." Antimicrob Agents Chemother **46**(10): 3156-3163.
- Bronzwaer, S., F. Aarestrup, et al. (2008). "Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union." CI Microbiol Infect **14**(6): 522-533.
- Broughton, E. I., H. M. Heffernan, et al. (2010). "*Salmonella enterica* serotypes and antibiotic susceptibility in New Zealand, 2002-2007." Epidemiol Infect **138**(3): 322-329.
- Burkhardt, J., J. Walterspiel, et al. (1997). "Quinolone arthropathy in animals versus children." Clin. Infect. Dis. **25**: 1196-1204.
- Bush, K., G. A. Jacoby, et al. (1995a). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob Agents Chemother **39**(6): 1211-1233.
- Bush, L. M., J. Calmon, et al. (1995b). "Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors." Infect Dis Clin North Am **9**(3): 653-686.
- Butaye, P., A. Cloeckert, et al. (2003). "Mobile genes coding for efflux pump-mediated antimicrobial resistance in Gram positive and Gram negative bacteria." Int J Antimicrobial Agents **22**: 205-210.

- Butaye, P., G. B. Michael, et al. (2006). "The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes." *Microbes Infect* **8**(7): 1891-1897.
- Bywater, R., H. Deluyker, et al. (2004). "A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals." *J Antimicrob Chemother* **54**(4): 744-754.
- Campos, MJG. (2007). Resistencia frente a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella enterica* aisladas en Extremadura de casos clínicos humanos. MPhil, Universidad de Extremadura.
- Campos, MJG. (2011). Resistencia a los antimicrobianos en cepas del género "Salmonella" aisladas de casos clínicos humanos en Extremadura. PhD, Universidad de Extremadura.
- Cano, M. E., J. M. Rodríguez-Martínez, et al. (2009). "Detection of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Isolates of *Enterobacter* spp. in Spain." *J Clin Microbiol* **47**(7): 2033-2039.
- Cantón, R. (2009). "Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting." *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 1**: 20-25.
- Cantón, R. (2008). Epidemiology and Evolution of Beta-Lactamases. *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. F. Baquero, C. Nombela, G. Cassell and J. Gutiérrez-Fuentes. Washington, DC, ASM Press: 249-270.
- Capita, R., C. Alonso-Calleja, et al. (2007). "Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain." *J Appl Microbiol* **103**(5): 1366-1375.
- Capoor, M. R., D. Nair, et al. (2009). "Molecular analysis of high-level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi and S. Paratyphi A: need to expand the QRDR region?" *Epidemiol Infect* **137**(6): 871-878.
- Carattoli, A. (2008). Evolution of Plasmids and Evolution of Virulence and Antibiotic-Resistance. *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens*. F. Baquero, C. Nombela et al. Washington, DC, ASM Press: 155-166.

- Caravaca, F. (2003). Bases de la producción animal. Sevilla, Universidad de Sevilla.
- Casadesus, J. (2011). "Salmonella: from basic science to clinical issues." Future Microbiol **6**(2): 133-135.
- Cattoir, V. and P. Nordmann (2009). "Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Gram-Negative Bacterial Species: An Update." Current Medicinal Chemistry **16**(8): 1028-1046.
- Cattoir, V., L. Poirel, et al. (2007). "Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates." J Antimicrob Chemother **60**(2): 394-397.
- Cattoir, V., F. X. Weill, et al. (2007b). "Prevalence of qnr genes in *Salmonella* in France." J Antimicrob Chemother **59**(4): 751-754.
- Cavaco, L. M. and F. M. Aarestrup (2009a). "Evaluation of Quinolones for Use in Detection of Determinants of Acquired Quinolone Resistance, Including the New Transmissible Resistance Mechanisms qnrA, qnrB, qnrS, and aac(6')Ib-cr, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and Determinations of Wild-Type Distributions." J Clin Microbiol **47**(9): 2751-2758.
- Cavaco, L. M., H. Hasman, et al. (2009b). "qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin." Antimicrob Agents Chemother **53**(2): 603-608.
- Cavaco, L. M., R. S. Hendriksen, et al. (2007). "Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 detected in *Salmonella enterica* serovar Corvallis strains isolated in Denmark and Thailand." J Antimicrob Chemother **60**(3): 704-706.
- Cerquetti, M., A. García-Fernández, et al. (2009). "First Report of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant qnrS1 in an *Escherichia coli* Strain of Animal Origin in Italy." Antimicrob Agents Chemother **53**(7): 3112-3114.
- Chen, S., S. Cui, et al. (2007). "Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials." Antimicrob Agents Chemother **51**(2): 535-542.

- Chen, S., S. Zhao, et al. (2004). "Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats." Appl Environ Microbiol **70**(1): 1-7.
- Cheng, H. R. and N. Jiang (2006). "Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts." Biotechnol Lett **28**(1): 55-59.
- Chin, N. X., J. W. Gu, et al. (1992). "In vitro activity of cefquinome, a new cephalosporin, compared with other cephalosporin antibiotics." Diagn Microbiol Infect Dis **15**(4): 331-337.
- Choi, S. H., J. H. Woo, et al. (2005). "Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance." J Antimicrob Chemother **56**(6): 1111-1114.
- Chuanchuen, R., C. Koowatananukul, et al. (2008). "Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates." Southeast Asian J Trop Med Public Health **39**(3): 419-424.
- Cissell, R. L. (2006). Occurrence of Antibiotic Resistance in Environmental and Amphibian "E. coli" isolates Associated with Cattle and Aquatic Environments. Master of Science Degree, University of Tennessee.
- Cizek, A. and K. Kovarik (1994a). "Antibiotic resistance in strains of *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis* isolated from poultry in the Czech Republic 1991-1992" Vet Med (Praha) **39**(9): 551-557.
- Cizek, A., I. Literak, et al. (1994b). "*Salmonella* contamination of the environment and its incidence in wild birds." Zentralbl Veterinarmed B **41**(5): 320-327.
- Clarke, R. and C. Gyles (1993). "*Salmonella*". Pathogenesis of bacterial infections in animals. C. Gyles and C. Thoen. Ames, Iowa State University Press: 133-153.
- Clothier, K. A., J. M. Kinyon, et al. (2010). "Comparison of *Salmonella* serovar isolation and antimicrobial resistance patterns from porcine samples between 2003 and 2008." J Vet Diagn Invest **22**(4): 578-582.
- Comisión de las Comunidades Europeas (2000). Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria: 61.

- Connell, S., D. Tracz, et al. (2003). "Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance." Antimicrob. Agents Chemother. **47**: 3675-3681.
- Corre, C. H., P. Y. Donnio, et al. (1998). "Increasing incidence of nalidixic acid resistance and susceptibility to quinolones of *Salmonella typhimurium* strains isolated in humans or animals." Pathologie Biologie **46**(8): 587-590.
- Corre, C. H. L., P. Y. Donnio, et al. (1999). "Increasing incidence and comparison of nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype typhimurium isolates from humans and animals." J Clin Microbiol **37**(1): 266-269.
- Cossart, P. and M. Lecuit (2000). *Microbial Pathogens: an Overview*. Cellular Microbiology. P. Cossart, P. Boquet et al. Washington, DC, American Society of Microbiology.
- Cox, L. A., Jr. and P. F. Ricci (2008). "Causal regulations vs. political will: why human zoonotic infections increase despite precautionary bans on animal antibiotics." Environ Int **34**(4): 459-475.
- Coyle, E., S. Palmer, et al. (1988). "*Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection: association with hen's eggs." Lancet **2**(8623): 1295-1297.
- Creus, E. (2010). "El control de la salmonelosis en la Unión Europea." Suis **73**: 14-22.
- Cruchaga, S., A. Echeita, et al. (2001). "Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998." J Antimicrob Chemother **47**(3): 315-321.
- Crump, J. A., F. M. Medalla, et al. (2011). "Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007." Antimicrob Agents Chemother **55**(3): 1148-1154.
- Crump, J. A. and E. D. Mintz (2010). "Global trends in typhoid and paratyphoid fever." Clin Infect Dis **50**(2): 241-246.
- Dahshan, H., T. Chuma, et al. (2010). "Characterization of antibiotic resistance and the emergence of AmpC-producing *Salmonella* Infantis from pigs." J Vet Med Sci **72**(11): 1437-1442.

- Daniel, R. G., P. Barrow, et al. (1997). "*Salmonella* hindmarsh infection in sheep and ponies." Vet Rec **141**(8): 203.
- Daschner, A., A. Alonso-Gomez, et al. (1999). "Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis." Clin Exp Allergy **29**(9): 1260-1264.
- De Busser, E. V., J. Dewulf, et al. (2009). "Effect of organic acids in drinking water during the last 2 weeks prior to slaughter on *Salmonella* shedding by slaughter pigs and contamination of carcasses." Zoonoses Public Health **56**(3): 129-136.
- de Jong, A., R. Bywater, et al. (2009). "A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals." J Antimicrob Chemother **63**(4): 733-744.
- de la Torre, E., D. Zapata, et al. (2003). "Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302." J Clin Microbiol **41**(6): 2395-2400.
- De la torre, E., D. Zapata, et al. (2003). "Several "*Salmonella enterica*" subsp. "*enterica*" serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302." J. Clinical Microbiology **41**: 2393-2400.
- de Toro, M., B. Rojo-Bezares, et al. (2010). "In vivo selection of aac(6')-Ib-cr and mutations in the gyrA gene in a clinical qnrS1-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment." J Antimicrob Chemother **65**(9): 1945-1949.
- Delgado Ronda, N., J. L. Muñoz Bellido, et al. (2006). "Molecular epidemiology of drug-resistant *Salmonella* Typhimurium in Spain." Rev Esp Quimioter **19**(2): 152-160.
- Delgado Ronda, M., J. L. Muñoz Bellido, et al. (2004). "Antimicrobial drug resistance in non-typhi *Salmonellae* in Castilla y Leon." Rev Esp Quimioter **17**(1): 29-36.
- Dependencia, C. d. S. y. (2009). Plan de Salud de Extremadura 2009-2012. Mérida, Junta de Extremadura: 573.

- Dierikx, C., A. van Essen-Zandbergen, et al. (2010). "Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry." Vet Microbiol.
- Decisión CE 2007/407. "Sobre la vigilancia armonizada de la resistencia a los microbianos en al *Salmonella* en aves de corral y cerdos". DOUE 14/6/07.
- Decisión CE 2007/516. "Relativa a la ayuda financiera de la Comunidad a un estudio que ha de realizarse en los Estados miembros sobre la prevalencia y la Resistencia a los antibióticos del género *Campylobacter* en manadas de pollos de engorde y sobre la prevalencia del género *Campylobacter* y el género *Salmonella* en las canales de pollos de engorde". DOUE, 21/07/07.
- Directiva 2003/99. "Sobre la vigilancia de la zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo." DOUE, 12/12/03.
- Dolejska, M., B. Bierosova, et al. (2009). "Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls." J Appl Microbiol **106**(6): 1941-1950.
- Domínguez, L. (2009). Implicaciones de las resistencias antimicrobianas en salud pública humana y veterinaria. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología, Almería, SEM.
- Domínguez, L. and S. Téllez (2010). El agente: Género "*Salmonella*". Salmonella al día. L. Domínguez, A. Hernández et al. Madrid, Merial Laboratorios.
- Doublet, B., K. Praud, et al. (2009). "Association of IS26-composite transposons and complex In4-type integrons generates novel multidrug resistance loci in *Salmonella* genomic island 1." J Antimicrob Chemother **63**(2): 282-289.
- Douris, A., P. J. Fedorka-Cray, et al. (2008). "Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Agona Slaughter Isolates from the Animal Arm of the National Antimicrobial Resistance Monitoring System Enteric Bacteria (NARMS): 1997 through 2003." Microbial Drug Resistance **14**(1): 55-63.
- Eaves, D. J., L. Randall, et al. (2004). "Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with

- antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 4012-4015.
- Eaves, D. J., E. Liebana, et al. (2002). "Detection of gyrA mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* by denaturing high-performance liquid chromatography." J Clin Microbiol **40**(11): 4121-4125.
- Echeita, M., A. Aladueña, et al. (2005). "Serotype and phage type distribution of human "Salmonella" strains isolated in Spain, 1997-2001". Enferm Infecc. Microbiol. Clin. **23**: 127-134.
- EFSA (2010a). "The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008". Parma, EFSA J. **8**(1): 1496.
- EFSA (2010b). "The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic agents from animals and food in the European Union in 2004-2007." EFSA J **8**(4): 304.
- EFSA (2010c). "The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic agents from animals and food in the European Union in 2008." EFSA J. **8**(7): 261.
- EFSA (2009a). "The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007". Parma, EFSA J. 223.
- EFSA (2009b). "Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: Salmonella prevalence estimates. EFSA J. **7**(12): 93.
- EFSA (2008). "Report of the Task Force on Zoonosis Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs, Par A". EFSA J. **135**:1-111
- EFSA (2007). "Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus". Parma, EFSA J. 97.

- Emborg, H. D., H. Vigre, et al. (2007). "Tetracycline Consumption and Occurrence of Tetracycline Resistance in *Salmonella* Typhimurium Phage Types from Danish Pigs." Microbial Drug Resistance **13**(4): 289-294.
- Escribano, I., J. C. Rodríguez, et al. (2004). "Mutations in the *gyrA* gene in *Salmonella enterica* clinical isolates with decreased ciprofloxacin susceptibility." Int J Antimicrob Agents **24**(3): 102-105.
- Essack, S. Y., L. M. Hall, et al. (2001). "Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa." Antimicrob Agents Chemother **45**(1): 88-95.
- EUCAST (2003). "Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution." CMI **9**: 1-7.
- EUCAST (2000a). "EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents." Clin Microbiol Infect **6**(9): 503-508.
- EUCAST (2000b). "EUCAST Definitive Document E.DEF 2.1, August 2000: Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints." Clin Microbiol Infect **6**(10): 570-572.
- Fabrega, A., S. Madurga, et al. (2009). "Mechanism of action of and resistance to quinolones". Microbiol Biotech **2**(1): 40-61.
- Fabrega, A., J. Sánchez-Céspedes, et al. (2008). "Quinolone resistance in the food chain." Int J Antimicrob Agents **31**(4): 307-315.
- Fakhr, M. K., L. K. Nolan, et al. (2005). "Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." J Clin Microbiol **43**(5): 2215-2219.
- Faure, S. (2009). Transfert d'un gène de résistance aux beta-lactamines blaCTX-M9 entre "Salmonella" et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. PhD, Université de Rennes.

- Fluit, A. C. and F. J. Schmitz (2004). "Resistance integrons and super-integrons." Clin Microbiol Infect **10**(4): 272-288.
- Fluit, A. C. and F. J. Schmitz (1999). "Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **18**(11): 761-770.
- Foley, S. L. and A. M. Lynne (2008). "Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance." J Anim Sci **86**(14 Suppl): E173-187.
- Fraj Lazaro, J., B. Remacha Tomey, et al. (1998). "Anisakis, anisakiasis and IgE-mediated immunity to Anisakis simplex." J Investig Allergol Clin Immunol **8**(1): 61-63.
- Frye, J. G., R. L. Lindsey, et al. (2011). "Related Antimicrobial Resistance Genes Detected in Different Bacterial Species Co-isolated from Swine Fecal Samples." Foodborne Pathog Dis.
- Frye, J. G., P. J. Fedorka-Cray, et al. (2008). "Analysis of *Salmonella enterica* with reduced susceptibility to the third-generation cephalosporin ceftriaxone isolated from U.S. cattle during 2000-2004." Microbial Drug Resistance **14**(4): 251-258.
- Galimand, M., S. Sabtcheva, et al. (2005). "Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2949-2953.
- Galán, J. C. (2008). Phage-Shaping Evolution of Bacterial Pathogenicity and Resistance. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. F. Baquero, C. Nombela, G. Cassell and J. Gutiérrez-Fuentes. Washington, DC, ASM Press: 167-184.
- García, N. (2010). Estudio de mecanismos de resistencia a antimicrobianos beta-lactámicos en bacterias anaerobias estrictas aisladas de infecciones humanas y animales, PhD Universidad de Extremadura.
- García, P., B. Guerra, et al. (2010). "IncA/C plasmids mediate antimicrobial resistance linked to virulence genes in the Spanish clone of the emerging *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i." J Antimicrob Chemother.

- García-Feliz, C., J. A. Collazos, et al. (2008). "Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from apparently healthy and clinically ill finishing pigs in Spain." Zoonoses Public Health **55**(4): 195-205.
- García-Feliz, C., J. A. Collazos, et al. (2007). "*Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units." Zoonoses Public Health **54**(8): 294-300.
- García-Fernández, A., D. Fortini, et al. (2009). "Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in Salmonella." J Antimicrob Chemother **63**(2): 274-281.
- García Fernández, A., A. Cloeckert, et al. (2007). "Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying blaCTX-M-2 or blaCTX-M-9 from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans." Antimicrob Agents Chemother **51**(11): 4177-4180.
- Garrity, G., D. Boone, et al. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer.
- Gay, K., A. Robicsek, et al. (2006). "Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*." Clin Infect Dis **43**(3): 297-304.
- Gebreyes, W. A., S. Thakur, et al. (2008). "Occurrence of virulence gene spvA and role on the clinical significance of multi-drug resistant Salmonella." J Clin Microbiol.
- Gebreyes, W. A., C. Altier, et al. (2006a). "Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches." Epidemiol Infect **134**(1): 187-198.
- Gebreyes, W. A., S. Thakur, et al. (2006b). "Comparison of prevalence, antimicrobial resistance, and occurrence of multidrug-resistant Salmonella in antimicrobial-free and conventional pig production." J Food Prot **69**(4): 743-748.
- Gebreyes, W. A. and S. Thakur (2005). "Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 503-511.

- Gebreyes, W. A., S. Thakur, et al. (2004). "Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000." J Antimicrob Chemother **53**(6): 997-1003.
- Gebreyes, W. A. and C. Altier (2002). "Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine." J Clin Microbiol **40**(8): 2813-2822.
- Giraud, E., S. Baucheron, et al. (2006). "Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies." Microbes Infect **8**(7): 1937-1944.
- Giraud, E., A. Brisabois, et al. (1999). "Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field." Antimicrob Agents Chemother **43**(9): 2131-2137.
- Glenn, L. M., R. L. Lindsey, et al. (2011). "Analysis of Antimicrobial Resistance Genes Detected in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated from Food Animals." Microb Drug Resist. In press.
- Glynn, M., C. Bopp, et al. (1998). Emergence of multidrug-resistant "*Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States". N En J Med. **338**: 1333-1338.
- Gómez, S., M. C. Porrero, et al. (2009). Elementos responsables de la virulencia de "Salmonella". Salmonella al día. L. Domínguez, A. Hernández et al. Madrid, Merial.
- Gómez, T., Y. Motarjemi, et al. (1997). Foodborne salmonellosis. World Health Stat. Q. **50**: 81-89.
- Gómez-Laguna, J., M. Hernández, et al. (2010). "Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* infections in free-range pigs." Vet J. In press.
- González-Sanz, R., S. Herrera-León, et al. (2009). "Emergence of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC-type beta-lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005." J Antimicrob Chemother **64**(6): 1181-1186.

- Gousia, P., V. Economou, et al. (2011). "Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products." Foodborne Pathog Dis **8**(1): 27-38.
- Goyache, J. and V. Briones (2006). Géneros "Salmonella" y "Shigella". Manual de Microbiología para Estudiantes de Veterinaria. S. Vadillo, S. Píriz et al. Madrid, Universidad de Extremadura-Librería Técnica Figueroa: 327-339.
- Greene, S. K., A. M. Stuart, et al. (2008). "Distribution of multidrug-resistant human isolates of MDR-ACSSuT *Salmonella typhimurium* and MDR-AmpC *Salmonella Newport* in the United States, 2003-2005." Foodborne Pathog Dis **5**(5): 669-680.
- Griffith, R., K. Schwartz, et al. (2006). *Salmonella*. Diseases of Swine. B. Straw, J. Zimmerman et al. Victoria (Australia), Blackwell Publishing: 739-754.
- Griggs, D. J., K. Gensberg, et al. (1996). "Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals." Antimicrob Agents Chemother **40**(4): 1009-1013.
- Guardabassi, L. and P. Courvalin (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. F. Aarestrup. Washington DC, ASM Press: 1-19.
- Guerra, B., S. Soto, et al. (2000). "Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes." Antimicrob Agents Chemother **44**(8): 2166-2169.
- Gunell, M., M. A. Webber, et al. (2009). "Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype." Antimicrob Agents Chemother **53**(9): 3832-3836.
- Güerri, M., A. Aladueña, et al. (2004). "Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate." Int J Antimicrob Agents **24**(4): 327-333.
- Gyles, C. L. (2008). "Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry." Anim Health Res Rev **9**(2): 149-158.

- Hacker, J. (2008). Evolution of Genomics Islands and Evolution of Pathogenicity. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. F. Baquero, C. Nombela et al. Washington, DC, ASM Press: 129-139.
- Hakanen, A., P. Kotilainen, et al. (1999). "Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in salmonelias and validation of nalidixic acid screening test." J Clin Microbiol **37**(11): 3572-3577.
- Hall, R. M. and H. W. Stokes (1993). "Integrans: Novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination." Genetica **90**(2-3): 115-132.
- Han, J., D. E. David, et al. (2011). "Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from human patients with those from animal and food sources." J Clin Microbiol **49**(3): 1130-1133.
- Harbottle, H., D. G. White, et al. (2006). "Comparison of Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Antimicrobial Susceptibility Typing for Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolates." J Clin Microbiol **44**(7): 2449-2457.
- Hata, M., M. Suzuki, et al. (2005). "Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 801-803.
- Hauser, E., E. Tietze, et al. (2010). "Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans." Appl Environ Microbiol **76**(14): 4601-4610.
- Hawkey, P. M. (2003). "Mechanisms of quinolone action and microbial response." J Antimicrob Chemother **51**: 29-35.
- Helms, M., J. Simonsen, et al. (2004). "Quinolone resistance is associated with increased risk of invasive illness or death during infection with *Salmonella* serotype Typhimurium." J Infect Dis **190**(9): 1652-1654.
- Hendriksen, R. S., A. M. Seyfarth, et al. (2009). "Results of use of WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007." J Clin Microbiol **47**(1): 79-85.

- Hendriksen, R. S., A. R. Vieira, et al. (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 Pathog Dis. In Press.
- Hernández, T., C. Rodríguez-Alvarez, et al. (2002). "Antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from chickens in Spain." J Chemother **14**(4): 346-350.
- Hernández, A. (2007). Estudio epidemiológico sobre la contaminación por "Salmonella" spp. en lotes de gallinas ponedoras de la comunidad valenciana (Epidemiological study about "Salmonella" spp. in laying hens herds from Valencia Region). PhD, Universidad Cardenal Herrera-CEU.
- Herrera-León, S., R. González-Sanz, et al. (2010). "Characterization of multidrug-resistant Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain." J Antimicrob Chemother. **66** (2):287-90.
- Herrera-León, S., R. González-Sanz, et al. (2010). "Spread of a multiresistant CTX-M-9-producing *Salmonella enterica* serotype Virchow phage type 19 in Spain." Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **29**(7) :901-5.
- Higgins, P. G., A. C. Fluit, et al. (2003). "Fluoroquinolones: Structure and target sites." Current Drug Targets **4**(2): 181-190.
- Hohmann, E. L. (2001). "Nontyphoidal salmonellosis." Clin Infect Dis **32**(2): 263-269.
- Hoogenboom, L. A., J. G. Bokhorst, et al. (2008). "Contaminants and microorganisms in Dutch organic food products: a comparison with conventional products." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess **25**(10): 1195-1207.
- Hopkins, K., M. Kirchner, et al. (2010). "Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain?" Euro Surveill **15**(22): 19580.
- Hopkins, K. L., E. J. Threlfall, et al. (2008). "Identification of novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-57 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Int J Antimicrob Agents **31**(1): 85-86.**25**(5): 358-373.

- Hopkins, K. L., M. Day, et al. (2008). "Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom." Emerg Infect Dis **14**(2): 340-342.
- Hopkins, K. L., C. Arnold, et al. (2007). "Rapid detection of gyrA and parC mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing (R) technology." J Microb Methods **68**(1): 163-171.
- Hopkins, K. L., L. Wootton, et al. (2007). "Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK." J Antimicrob Chemother **59**(6): 1071-1075.
- Hopkins, K. L., R. H. Davies, et al. (2005). "Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments." Int J Antimicrob Agents **25**(5): 358-73
- HPSC (2009). Annual report 2008. Dublin, Ireland, Health Protection Surveillance Centre: 135.
- Hsu, S. C., T. H. Chiu, et al. (2006). "Characterisation of antimicrobial resistance patterns and class 1 integrons among *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis strains isolated from humans and swine in Taiwan." Int J Antimicrob Agents **27**(5): 383-391.
- Huang, T. M., Y. F. Chang, et al. (2004). "Detection of mutations in the gyrA gene and class I integron from quinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates in Taiwan." Vet Microbiol **100**(3-4): 247-254.
- Hudson, C. R., C. Quist, et al. (2000). "Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States." J Clin Microbiol **38**(5): 1860-1865.
- Huehn, S., R. La Ragione, et al. (2010). "Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars Relevant to human health in Europe." Foodborne Pathog Dis **7**(5): 523-535.
- Hurley, A., J. J. Maurer, et al. (2008). "Using bacteriophages to modulate *Salmonella* colonization of the chicken's gastrointestinal tract: Lessons learned from in silico and in vivo modeling." Avian Diseases **52**(4): 599-607.

- Ibar, M. P., G. Vigo, et al. (2009). "Serovars of *Salmonella enterica* subspecies enterica and its antimicrobial resistance in slaughterhouse pigs." Rev Argent Microbiol **41**(3): 156-162.
- Izumiya, H., T. Sekizuka, et al. (2011). "Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome." Antimicrob Agents Chemother **55**(2): 623-630.
- Jacoby, G., V. Cattoir, et al. (2008). "qnr gene nomenclature." Antimicrob Agents Chemother **52**(7): 2297-2299.
- Jacoby, G. A., K. E. Walsh, et al. (2006). "qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1178-1182.
- Jansson, C., A. Franklin, et al. (1992). "Spread of a newly found trimethoprim resistance gene, dhfrIX, among porcine isolates and human pathogens." Antimicrob Agents Chemother **36**(12): 2704-2708.
- Jensen, A. N., A. Dalsgaard, et al. (2006). "Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in an outdoor organic pig farming environment." Appl Environ Microbiol **72**(3): 1833-1842.
- Kahlmeter, G., D. Brown, et al. (2006). "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing." Clin Microbiol Infect **12**(6): 501-503.
- Kaplan, W. and R. Laing (2004). Priority Medicines for Europe and the World, WHO-Department of Essential Drugs and Medicines Policy.
- Kapperud, G., H. Stenwig, et al. (1998). "Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4-12 infection in Norway: evidence of transmission from an avian wildlife reservoir." Am J Epidemiol **147**(8): 774-782.
- Karatzas, K. A. G., M. A. Webber, et al. (2007). "Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness." J Antimicrob Chemother **60**(5): 947-955.

- Kaura, Y. K., V. K. Sharma, et al. (1982). "Enterotoxigenicity and invasiveness of *Salmonella* species." Antonie Van Leeuwenhoek **48**(3): 273-283.
- Kehrenberg, C., A. de Jong, et al. (2007). "Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations." J Antimicrob Chemother **59**(5): 886-892.
- Khemtong, S. and R. Chuanchuen (2008). "Class 1 integrons and *Salmonella* genomic island 1 among *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine." Microbial Drug Resistance **14**(1): 65-70.
- Kehrenberg, C., A. d. Jong, et al. (2007a). "Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations." J Antimicrob Chemother **59**(5): 886-892.
- Kehrenberg, C., K. L. Hopkins, et al. (2007b). "Complete nucleotide sequence of a small qnrS1-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193." J Antimicrob Chemother **60**(4): 903-905.
- Kehrenberg, C., S. Friederichs, et al. (2006). "Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene qnrS in *Salmonella enterica* serovar Infantis." J Antimicrob Chemother **58**(1): 18-22.
- Kilmartin, D., D. Morris, et al. (2005). "Clonal expansion may account for high levels of quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar enteritidis." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2587-2591.
- Kim, J. S., K. H. Kim, et al. (2005). "Immunochemical and biological analysis of allergenicity with excretory-secretory products of anisakis simplex third stage larva." Int Arch Allergy Immunol **136**(4): 320-328.
- Kim, K. Y., J. H. Park, et al. (2011). "Characterization of the quinolone resistance mechanism in foodborne *Salmonella* isolates with high nalidixic acid resistance." Int J Food Microbiol **146**(1): 52-56.

- Kim, S., S. H. Kim, et al. (2009). "An additional novel antimicrobial resistance gene cluster in Salmonella genomic island 1 of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 human isolate." Foodborne Pathog Dis **6**(4): 471-479.
- Kitadai, N., N. Ninomiya, et al. (2010). "*Salmonella* isolated from the feces of migrating cranes at the Izumi Plain (2002-2008): Serotype, antibiotic sensitivity and PFGE type." J Vet Med Sci **72**(7): 939-942.
- Lancini, G., F. Parenti, et al. (1995). Antibiotics. A multidisciplinary approach. Washington, DC, ASM Press.
- Landeras, E., M.A. González-Hevia, et al. (1996). "Epidemiological differentiation of pathogenic Strains of *Salmonella* Enteritidis by ribotyping." J Clin Microbiol. **34**: 2294-2296.
- Laorden, L., S. Herrera-Leon, et al. (2010). "Genetic evolution of the Spanish multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- monophasic variant." J Clin Microbiol **48**(12): 4563-4566.
- Larangeira, L. F. (2008). "Salmonella" sp. em répteis e aves silvestres no Estado de Sao Paulo: Frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as conseqüências para o manejo em cativeiro e reintrodução. MA in Science, Universidade de Sao Paulo.
- Lawson, A. J., M. U. Chart, et al. (2002). "Heterogeneity in expression of lipopolysaccharide by strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium definitive phage type 104 and related phage types". Lett. Appl Microb, **34**: 428-432.
- Le Minor, L. and M. Popoff (1987). Designation of "*Salmonella enterica*" sp. nov. nom. rev. as the type and the only species of the genus "*Salmonella*". Int. J. Sys. Bact. **357**: 46-468.
- Le Minor, L. (1966). Supplement to the Kauffmann-White table (IX). Ann. Inst. Pasteur (Paris). **111**: 470-477.
- Lee, K. E., J. H. Jung, et al. (2011). "Characterization of nalidixic Acid-resistant and fluoroquinolone-reduced susceptible *Salmonella* Typhimurium in Swine." J Food Prot **74**(4): 610-615.

- Lescat, M., A. Calteau, et al. (2009). "A module located at a chromosomal integration hot spot is responsible for the multidrug resistance of a reference strain from *Escherichia coli* clonal group A." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2283-2288.
- Lestari, S. I., F. Han, et al. (2009). "Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars in conventional and organic chickens from Louisiana retail stores." J Food Prot **72**(6): 1165-1172.
- Leverstein-Van Hall, M., A. Paauw, et al. (2002). "Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital." J. Clin. Microbiol. **40**: 3038-3040.
- Levesque, C., L. Piche, et al. (1995). "PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes." Antimicrob Agents Chemother **39**: 185-191.
- Levings, R. S., S. R. Partridge, et al. (2007). "SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky." Antimicrob Agents Chemother **51**(1): 317-323.
- Li, X. Z., M. Mehrotra, et al. (2007). " β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin." Vet Microbiol **121**(3-4): 197-214.
- Li, X. Z. (2005). "Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms." Int J Antimicrob Agents **25**(6): 453-463.
- Liebana, E., C. Clouting, et al. (2002). "Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales." J Clin Microbiol **40**(4): 1481-1486.
- Limbort, M., D. Isert, et al. (1991). "Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin." Antimicrob Agents Chemother **35**(1): 14-19.
- Ling, J. M., E. W. Chan, et al. (2003). "Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant salmonellae in Hong Kong." Antimicrob Agents Chemother **47**(11): 3567-3573.

- Literak, I., R. Vanko, et al. (2007). "Antibiotic resistant *Escherichia coli* and Salmonella in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic." Lett Appl Microbiol **45**(6): 616-621.
- Livermore, D. M. (1995). "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clin Microbiol Rev **8**(4): 557-584.
- Lo Fo Wong, D., R. Hendriksen, et al. (2006). "External quality assurance system for antibiotic resistance in bacteria of animal origin in Europe (ARBAO-II), 2003." Vet Microbiol **115**(1-3): 128-139.
- Lorenzo, M. (2009). Estudio de mecanismos de resistencia a tetraciclina, eritromicina y otros antimicrobianos no beta-lactámicos en bacterias anaerobias estrictas aisladas de infecciones humanas y animales, PhD, Universidad de Extremadura.
- Lunn, A. D., A. Fabrega, et al. (2010). "Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among Salmonella spp. clinical isolates." Int Microbiol **13**(1): 15-20.
- Ma, J. Y., Z. L. Zeng, et al. (2009). "High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among Ceftiofur-Resistant Enterobacteriaceae Isolates from Companion and Food-Producing Animals." Antimicrob Agents Chemother **53**(2): 519-524.
- Machado, E., J. Ferreira, et al. (2007). "Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases in a spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003)." Antimicrob Agents Chemother **51**(6): 2201-2204.
- Majowicz, S. E., J. Musto, et al. (2010). "The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis." Clin Infect Dis **50**(6): 882-889.
- Majtan, T., L. Majtanova, et al. (2007). "Oligonucleotide microarray for molecular characterization and genotyping of *Salmonella* spp. strains." J Antimicrob Chemother **60**(5): 937-946.
- Majtanova, L., T. Majtan, et al. (2010). "Detection of the class 1 integrons and SGI1 among *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104, U302, DT120, DT193, and nontypable human isolates." Jpn J Infect Dis **63**(4): 292-295.

- Majtanova, L., T. Majtan, et al. (2007). "Molecular characterization of class 1 integrons in clinical strains of *Salmonella* Typhimurium isolated in Slovakia." Pol J Microbiol **56**(1): 19-23.
- Malorny, B., C. Bunge, et al. (2007). "Molecular characterisation of *Salmonella* strains by an oligonucleotide multiprobe microarray." Mol Cell Probes **21**(1): 56-65.
- MARM (2010a). Programa nacional para la vigilancia, control y erradicación de determinados serotipos de *Salmonella* en manadas de gallinas reproductoras de la especie *Gallus gallus*. Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria. Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos. Secretaría General de Medio Rural. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino: 38.
- MARM (2010b). Programa nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*. Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria. Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos. Secretaría General de Medio Rural. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino: 45.
- Martín-Pelaez, S., A. Costabile, et al. (2010). "Evaluation of the inclusion of a mixture of organic acids or lactulose into the feed of pigs experimentally challenged with *Salmonella* Typhimurium." Vet Microbiol **142**(3-4): 337-345.
- Martínez, J. L., F. Baquero, et al. (2007). "Predicting antibiotic resistance." Nat Rev Microbiol **5**(12): 958-965.
- Martínez, N., M. C. Mendoza, et al. (2007). "Detailed structure of integrons and transposons carried by large conjugative plasmids responsible for multidrug resistance in diverse genomic types of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg." J Antimicrob Chemother **60**(6): 1227-1234.
- Martínez-Martínez, L. and J. Calvo (2010). "The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation." Enferm Infecc Microbiol Clin **28 Suppl 2**: 25-31.
- Martinez-Martinez, L., M. E. Cano, et al. (2008). "Plasmid-mediated quinolone resistance." Expert Review of Anti-Infective Therapy **6**(5): 685-711.

- Martínez-Martínez, L., A. Pascual, et al. (1998). "Quinolone resistance from a transferable plasmid." Lancet **351**(9105): 797-799.
- Martínez, N. (2007). Virulencia, resistencia y elementos génicos móviles en serotipos no prevalentes de "Salmonella enterica". PhD, Universidad de Oviedo.
- Mateu, E. M., M. Martín, et al. (2002). "Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from swine in Catalonia, Spain." Vet Rec **150**(5): 147-150.
- Mathew, A. G., S. Liamthong, et al. (2009). "Evidence of class 1 integron transfer between *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. on livestock farms." Foodborne Pathog Dis **6**(8): 959-964.
- Matson, S. W., J. K. Sampson, et al. (2001). "F plasmid conjugative DNA transfer - The TraI helicase activity is essential for DNA strand transfer." J Biol Chem **276**(4): 2372-2379.
- Matthew, M., A. Harris, et al. (1974). "The Use of Analytical Isoelectric Focusing for Detection and Identification of beta-lactamases." J Gen Microbiol(88): 169-178.
- Maynard, C., S. Bekal, et al. (2004). "Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin." J Clin Microbiol **42**(12): 5444-5452.
- Mazel, D. (2008). Evolution of Integrons and Evolution of Antibiotic Resistance. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. F. Baquero, C. Nombela, G. Cassell and J. Gutiérrez-Fuentes. Washington, DC, ASM Press: 139-154.
- McDermott, P. (2006). Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal Salmonellae. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. F. M. Aarestrup. Washington DC, ASM Press: 293-314.
- McGee, L., F. C. Tenover, et al. (2008). Emergence, Spread, and Extinction of Pathogenic Bacterial Clones. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. F. Baquero, C. Nombela et al. Washington, DC, ASM Press: 185-196.
- Mejía, W., J. Casal, et al. (2006). "Epidemiology of salmonella infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated." Vet Rec **159**(9): 271-276.

- Mella, S. M., R. D. Blamey, et al. (2004). "[Bacteremic pneumococcal pneumonia and antibiotics]." Rev Med Chil **132**(10): 1258-1259; author reply 1260-1251.
- Mendoza Mdel, C., A. Herrero, et al. (2009). "Evolutionary engineering in *Salmonella*: emergence of hybrid virulence-resistance plasmids in non-typhoid serotypes". Enferm Infecc Microbiol Clin **27**(1): 37-43.
- Merino, L. A., J. M. Alonso, et al. (2007). "Resistance to quinolones in *Salmonella* Infantis due to overexpression of an active efflux system and a mutation in the *gyrA* gene." Enferm Infecc Micr Cl **25**(5): 357-358.
- Mevius, D., K. Veldman, et al. (2000). "Preliminary results of antibiotic resistance monitoring in the Netherlands." Tijdschr Diergeneeskd **125**(5): 143-146.
- Michael, G. B., M. Cardoso, et al. (2008). "Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron." Int J Antimicrob Agents **32**(2): 120-129.
- Michael, G. B., P. Butaye, et al. (2006). "Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update." Microbes Infect **8**(7): 1898-1914.
- Michael, G. B., M. Cardoso, et al. (2005). "Class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses in Brazil." J Antimicrob Chemother **55**(5): 776-779.
- Mikasova, E., H. Drahovska, et al. (2005). "Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains of veterinary origin by molecular typing methods." Vet Microbiol **109**(1-2): 113-120.
- Minarini, L. A. R., L. Poirel, et al. (2008). "Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil." J Antimicrob Chemother **62**(3): 474-478.
- Miriagou, V., A. Carattoli, et al. (2006). "Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids." Microbes Infect **8**(7): 1923-1930.

- Miro, E., C. Verges, et al. (2004). "Resistance to quinolones and beta-lactams in *Salmonella enterica* due to mutations in topoisomerase-encoding genes, altered cell permeability and expression of an active efflux system." Enferm Infect Micr Cl **22**(4): 204-211.
- Molbak, K. (2005). "Human health consequences of antimicrobial drug-resistant Salmonella and other foodborne pathogens." Clin Infect Dis **41**(11): 1613-1620.
- Molina, B. (2004). VI Censo Nacional de Cigüeña Blanca (6th White Stork population in Spain), SEO/BirdLife: 6.
- Moreno, M. Á. (2009). "Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antimicrobianos." Prof Vet **71**: 38-44.
- Mossong, J., P. Marques, et al. (2007). "Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006." Euro Surveill **12**(6): E11-12.
- Mulvey, M. R., D. A. Boyd, et al. (2006). "The genetics of Salmonella genomic island 1." Microbes Infect.
- Müller, S., D. Tappe, et al. (2011). "Resistance to ampicillin, third-generation cephalosporins, ciprofloxacin, co-trimoxazole and azithromycin in clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from Germany: Real problem or sporadic circumstance?" Scan J Infect Dis **43**(5): 389-391.
- Nagachinta, S. and J. Chen (2009). "Integron-mediated antibiotic resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*." J Food Prot **72**(1): 21-27.
- Neilson, F. J., K. T. Jagusch, et al. (1985). "Acute enteritis and deaths in sheep from *Salmonella* Hindmarsh associated with oral dosing with zinc oxide." N Z Vet J **33**(9): 148-149.
- Newell, D. G., M. Koopmans, et al. (2010). "Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge." Int J Food Microbiol **139**(SUPPL. 1).
- Nielsen, E. M., M. Torpdahl, et al. (2009). "Variation in Antimicrobial Resistance in Sporadic and Outbreak-related *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium." Emerg Infect Dis **15**(1): 101-103.

- Nisbet, D. (2002). "Defined competitive exclusion cultures in the prevention of enteropathogen colonisation in poultry and swine." Antonie Van Leeuwenhoek **81**(1-4): 481-486.
- Nogareda, J. (1988). Guía de productos zoonos sanitarios. Girona, Veterindustria.
- Nordmann, P. and L. Poirel (2005). "Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae." J Antimicrob Chemother **56**(3): 463-469.
- Old, D.C., E. J. Threlfall (1998). "Salmonella" Microbiology and Microbial Infections. Vol. 2. Ed. Balows, A. and Duerden, B.I.
- O'Mahony, R., M. Saugy, et al. (2005). "Antimicrobial resistance in isolates of *Salmonella* spp. from pigs and the characterization of an *S. Infantis* gene cassette." Foodborne Pathog Dis **2**(3): 274-281.
- O'Regan, E., T. Quinn, et al. (2008). "Multiple regulatory pathways associated with high-level ciprofloxacin and multi-drug resistance in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis - involvement of ramA and other global regulators." Antimicrob Agents Chemother.
- Otal, J. (2010). Resistencia y consumo de antibióticos en España y Europa. Majadahonda (Madrid), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).
- Pala, T. R. and A. Sevilla (2004). "Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant." J Food Prot **67**(8): 1624-1629.
- Palomo, G., M. Campos, et al. (2011). "Wide dissemination among human, poultry and wild animals of quinolone-resistant clonal strains of *Salmonella* Enteritidis." Submitted.
- Pang, T., B. Finlay, et al. (1995). "Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge". Trends Microbiol. **3**: 253-255.
- Park, C. H., A. Robicsek, et al. (2006). "Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme." Antimicrob Agents Chemother **50**(11): 3953-3955.

- Parry, C. (2003). "Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*." Curr Opin Infect Dis **16**(5): 467-472.
- Parry, C. M. and E. J. Threlfall (2008). "Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae." Curr Opin Infect Dis **21**(5): 531-538.
- Pasquali, F. and G. Manfreda (2007). "Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*." Vet Microbiol **119**(2-4): 304-310.
- Patchanee, P. (2008). Epidemiology of "Salmonella enterica" related to swine production system and food safety. PhD, The Ohio State University.
- Patchanee, P., B. M. Zewde, et al. (2008). "Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from humans and animals." Foodborne Pathog Dis **5**(6): 839-851.
- Pennycott, T. W., A. Park, et al. (2006). "Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003." Vet Rec **158**(24): 817-820.
- Perichon, B., P. Courvalin, et al. (2007). "Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **51**(7): 2464-2469.
- Perron, G. G., G. Bell, et al. (2008). "Parallel evolution of multidrug-resistance in *Salmonella enterica* isolated from swine." FEMS Microbiol Lett **281**(1): 17-22.
- Peters, T., C. Berghold, et al. (2007). "Relationship of pulsed-field profiles with key phage types of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Europe: results of an international multi-centre study." Epidemiol Infect **135**(8): 1274-1281.
- Peterson, G., J. Bai, et al. (2010). "Diagnostic microarray for human and animal bacterial diseases and their virulence and antimicrobial resistance genes." J Microbiol Methods **80**(3): 223-230.
- Plym, F. L., and M. Wierup (2006). "*Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products." Rev Sci Tech **25**(2): 541-554.

- Poirel, L., V. Cattoir, et al. (2008). "Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?" CI Microbiol Infect **14**(4): 295-297.
- Poirel, L., J. M. Rodriguez-Martinez, et al. (2005). "Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3523-3525.
- Poppof, M. and L. Le Minor (2001). Antigenic formulas of the "Salmonella" serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on "Salmonella".
- Prats, G., B. Mirelis, et al. (2000). "Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona." Antimicrob Agents Chemother **44**(5): 1140-1145.
- Preisler, A. and P. Heisig (2009). "The role of intra- and extragenic compensatory mutations in the suppression of fluoroquinolone resistance in a *Salmonella* Typhimurium gyrA mutant (D87G)." J Antimicrob Chemother **63**(2): 290-294.
- Prichett, L. C., M. E. Konket, et al. (2000). "Identificación de DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR". J Clin Microbiol, **38**:3484-3488.
- Píriz, S. (1989). Estudio microbiológico del pederero caprino en la provincia de Cáceres. PhD, Universidad de Extremadura.
- Quiles, A. and M. L. Hevia (2006). Control de la salmonelosis en las explotaciones porcinas, Producción Animal. **21**: 20-38.
- Quinn, T., R. O'Mahony, et al. (2006). "Multi-drug resistance in *Salmonella enterica*: efflux mechanisms and their relationships with the development of chromosomal resistance gene clusters." Curr Drug Targets **7**(7): 849-860.
- Quiroga, M. P., P. Andrés, et al. (2007). "Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina." Antimicrob Agents Chemother **51**(12): 4466-4470.
- Rabsch, W., H. Tschäpe, et al. (2001). Nontyphoidal salmonellosis: emerging problems, Microbes Infect. **3**: 237-247.

- Ramos, R., M. Cerda-Cuellar, et al. (2010). "Influence of refuse sites on the prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in seagulls." Appl Environ Microbiol **76**(9): 3052-3056.
- Randall, L. P., N. G. Coldham, et al. (2005). "Detection of mutations in *Salmonella enterica* *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) using standard HPLC instrumentation." J Antimicrob Chemother **56**(4): 619-623.
- Randall, L. P., S. W. Cooles, et al. (2004). "Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK." J Antimicrob Chemother **53**(2): 208-216.
- Rao, S., C. W. Maddox, et al. (2008). "Diagnostic accuracy of class 1 integron PCR method in detection of antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from swine production systems." J Clin Microbiol **46**(3): 916-920.
- Ray, P., J. Sharma, et al. (2006). "Predictive efficacy of nalidixic acid resistance as a marker of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* var Typhi." Indian J Med Res **124**(1): 105-108.
- Rayamajhi, N., S. G. Kang, et al. (2008). "Assessment of antibiotic resistance phenotype and integrons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from swine." J Vet Med Sci **70**(10): 1133-1137.
- Recchia, G. D. and R. M. Hall (1995). "Gene cassettes: A new class of mobile element." Microbiology **141**(12): 3015-3027.
- Reche, M. P., M. A. Echeita, et al. (2003a). "Comparison of phenotypic and genotypic markers for characterization of an outbreak of *Salmonella* serotype Havana in captive raptors." J Appl Microbiol **94**(1): 65-72.
- Reche, M. P., P. A. Jiménez, et al. (2003b). "Incidence of salmonellae in captive and wild free-living raptorial birds in central Spain." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **50**(1): 42-44.
- Reche, M. P., J. E. García de los Ríos, et al. (2002). "*gyrA* Mutations associated with nalidixic acid-resistant salmonellae from wild birds." Antimicrob Agents Chemother **46**(9): 3108-3109.

Real Decreto 1221/2009. "Por el que se establecen normas básicas de ordenación de las explotaciones de ganado porcino extensivo y por el que se modifica el Real Decreto 1547/2004, de 25 de junio, por el que se establecen las normas de ordenación de las explotaciones cunícolas". BOE 4/08/09.

Real Decreto 1469/2007 "Por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos" BOE 3/11/07.

Real Decreto 1254/1991. "Por el que se dictan normas para la preparación y conservación de la mayonesa de elaboración propia y otros alimentos de consumo inmediato en los que figure el huevo como ingrediente". BOE 03/08/91.

Reglamento CE 1003/2005. "Por el que se aplica el Reglamento (CE) 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto al objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de salmonella en las manadas reproductoras de Gallus gallus y se modifica el Reglamento (CE) 2160/2003". DOUE, 1/07/05.

Reglamento CE 2160/2003. "Sobre el control de la salmonella y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos". DOUE 12/12/03.

Riaño, I., M. A. Moreno, et al. (2006). "Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain." J Antimicrob Chemother **58**(4): 844-847.

Ribeiro, A. R. (2007). "Salmonella" Enteritidis de origem aviária: determinação de padrões de resistência antimicrobiana, detecção de mutação no gene *gyrA* de cepas resistentes ao ácido nalidíxico, fagotipagem e ribotipagem. PhD, Universidade do Rio Grande do Sul.

Ricci, V. and L. J. Piddock (2009). "Ciprofloxacin selects for multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediated by at least two different pathways." J Antimicrob Chemother.

Robicsek, A., G. A. Jacoby, et al. (2006). "The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance." Lancet Infect Dis **6**(10): 629-640.

- Robicsek, A., J. Strahilevitz, et al. (2006). "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase." Nature Medicine **12**(1): 83-88.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, et al. (2006). "qnr Prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2872-2874.
- Rodríguez, I., M. Rodicio, et al. (2008). "Class 1 integrons in multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002 and 2004." Int J Antimicrob Agents **32**(2): 158-164.
- Rodríguez-Ferri, E., C. B. Gutiérrez, et al. (1999). Samonella y Salmonelosis. Caja España, León.
- Rodríguez-Martínez, J. M., M. E. Cano, et al. (2010). "Plasmid-mediated quinolone resistance: an update." J Infect Chemother.
- Roesler, U., A. Vonaltrock, et al. (2005). "Effects of fluorequinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **52**(2): 69-74.
- Romani, C., A. Aleo, et al. (2008). "Characterization of multi-drug resistance in *Salmonella* strains isolated from animals." Ann Ist Super Sanita **44**(3): 292-300.
- Rosengren, L. (2007). Antimicrobial resistance of "Salmonella", "Escherichia coli" and "Campylobacter" from pigs on farm in Alberta and Saskatchewan Canada. PhD, University of Saskatchewan.
- Rowe-Magnus, D. and D. Mazel (2002). "The role of integrons in antibiotic resistance gene capture." Int. J. Med. Microbiol. **29**: 115-125.
- Ruíz, J. (2003). "Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection." J Antimicrob Chemother **51**(5): 1109-1117.

- Ruíz, J., L. Capitano, et al. (1999). "Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant *Salmonella typhimurium* strains isolated from fish." J Antimicrob Chemother **43**(5): 699-702.
- Salyers, A. and D. Whitt (2005). Revenge of the Microbes. Washington DC, ASM Press.
- Salyers, A. A. and D. D. Whitt (2002). Bacterial Pathogenesis. A molecular Approach. Washington DC, American Society of Microbiology.
- San Martín, B., L. Lapierre, et al. (2008). "Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine." Can J Microbiol **54**(7): 569-576.
- Sanches, T. C. (2008). Causas de morte em Passeriformes: comparação entre aves de vida livre residentes na Região Metropolitana de São Paulo e aves oriundas do tráfico. MA in Science, Universidade de São Paulo.
- Sandvang, D. and F. M. Aarestrup (2000). "Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine gentamicin-resistant *Escherichia coli*." Microbial Drug Resistance **6**(1): 19-27.
- Sauli, I., J. Danuser, et al. (2005). "Estimating the probability and level of contamination with *Salmonella* of feed for finishing pigs produced in Switzerland--the impact of the production pathway." Int J Food Microbiol **100**(1-3): 289-310.
- Sayah, R. S., J. B. Kaneene, et al. (2005). "Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1394-1404.
- Schlundt, J., H. Toyofuku, et al. (2004). Emerging food-borne zoonoses. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. **23**: 513-533.
- Scott Weese, J. (2008). "Antimicrobial resistance in companion animals." Anim Health Res Rev: 1-8.
- Seminati, C., W. Mejia, et al. (2005). "Mutations in the quinolone-resistance determining region (QRDR) of *Salmonella* strains isolated from pigs in Spain." Vet Microbiol **106**(3-4): 297-301.

- Seputiene, V., J. Povilonis, et al. (2006). "Quinolone resistance among "Salmonella enterica" and "Escherichia coli" in Lithuania." Biologija(3): 74-78.
- Simm, A. M., A. J. Baldwin, et al. (2007). "Investigating protein structural plasticity by surveying the consequence of an amino acid deletion from TEM-1 beta-lactamase." FEBS Lett **581**(21): 3904-3908.
- Singh, H., M. L. Dewan, et al. (1976). "Isolation of Salmonella hindmarsh (8 : r ; 1 : 5) in India." Indian J Med Res **64**(9): 1300-1301.
- Sjölund-Karlsson, M., R. Howie, et al. (2011). "CTX-M-producing non-Typhi *Salmonella* Spp. Isolated from humans, United States." Emerg Infect Dis **17**(1): 97-99.
- Sjolund-Karlsson, M., R. Howie, et al. (2010a). "Plasmid-mediated Quinolone Resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* Isolates, USA." Emerg Infect Dis **16**(11): 1789-1791.
- Sjölund-Karlsson, M., R. Rickert, et al. (2010b). "*Salmonella* isolates with decreased susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in the United States." Foodborne Pathog Dis **7**(12): 1503-1509.
- Sjolund-Karlsson, M., J. P. Folster, et al. (2009). "Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates from humans in the United States." Antimicrob Agents Chemother **53**(5): 2142-2144.
- Smith, J., M. Millar, et al. (2001) "Interventions against antimicrobial resistance: a review of the literature and exploration of modelling cost-effectiveness." Global Forum for Health Research, 6.
- Soler, P., R. González-Sanz, et al. (2006). "Antimicrobial resistance in non-typhoidal Salmonella from human sources, Spain, 2001-2003." J Antimicrob Chemother **58**(2): 310-314.
- Solnik-Isaac, H., M. Weinberger, et al. (2007). "Quinolone resistance of *Salmonella enterica* serovar virchow isolates from humans and poultry in Israel: Evidence for clonal expansion." J Clin Microbiol **45**(8): 2575-2579.

- Srivastava, M. K. (2010). "Antibiotic growth-promoters in food animals." Pharma Times **42**(3): 17-21.
- Stevenson, J. E., K. Gay, et al. (2007). "Increase in nalidixic acid resistance among non-typhi *Salmonella enterica* isolates in the United States from 1996 to 2003." Antimicrob Agents Chemother **51**(1): 195-197.
- Stoycheva, M. and M. Murdjeva (2006). "Antimicrobial therapy of salmonellosis--current state and perspectives." Folia Med (Plovdiv) **48**(1): 5-10.
- Strahilevitz, J., G. A. Jacoby, et al. (2009). "Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat." CI Microbiol Rw **22**(4): 664-+.
- Su, L. H. and C. H. Chiu (2007). "Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature." Chang Gung Med J **30**(3): 210-219.
- Sundstrom, L., G. Swedberg, et al. (1993). "Characterization of transposon Tn5086, carrying the site-specifically inserted gene dhfrVII mediating trimethoprim resistance." J Bacteriol **175**(6): 1796-1805.
- Swaminathan, B., T. J. Barrett, et al. (2006). "Surveillance for human Salmonella infections in the United States." JAOAC Int **89**(2): 553-559.
- Sánchez U, M., H. Bello T, et al. (2006). "[Transference of extended-spectrum beta-lactamases from nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae* to other species of Enterobacteriaceae]." Rev Med Chil **134**(4): 415-420.
- Taguchi, M., R. Kawahara, et al. (2009). "Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Salmonella* Isolated from Patients with Overseas Travelers' Diarrhea in Japan." Jap J Infect Dis **62**(4): 312-314.
- Taylor, D. J. and A. W. Philbey (2010). "Salmonella infections in garden birds and cats in a domestic environment." Vet Rec **167**(1): 26-27.
- Téllez, S. (2003). Estudio de la frecuencia de detección y caracterización de aislados de "Salmonella" spp. obtenidos de reptiles y anfibios. PhD, Universidad Complutense de Madrid.

- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, et al. (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." J Clin Microbiol **33**(9): 2233-2239.
- Terraz, J. C. (2011) Salmonella en explotaciones avícolas ecológicas. E-mail 12may.
- TFoZD, C.-E. (2007). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in "Salmonella" in fowl ("Gallus gallus"), turkeys and pigs and "Campylobacter jejuni" and "C. coli" in broilers. Parma, EFSA.
- Thornton, L., S. Gray, et al. (1993). "The problems of tracing a geographically widespread outbreak of salmonellosis from a commonly eaten food: Salmonella typhimurium DT193 in north west England and north Wales in 1991." Epidemiol Infect **111**(3): 465-471.
- Thorsteinsdottir, T. R., K. G. Kristinsson, et al. (2007). "Antimicrobial resistance and serotype distribution among Salmonella spp. in pigs and poultry in Iceland, 2001-2005." Microb Drug Resist **13**(4): 295-300.
- Threlfall, E.J, (2000). "Epidemic Salmonella Typhimurium DT104 –a truly international multiresistant clone". J Antimicrob Chemother. 46: 7-10.
- Torpdahl, M., M. N. Skov, et al. (2005). "Genotypic characterization of Salmonella by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains of veterinary origin by molecular typing methods." J Microbiol Methods **63**(2): 173-184.
- Towner, K. (1995). Mechanisms of acquired resistance. Antimicrobial Chemotherapy. D. Greenwood. Nottingham, Oxford University Press: 147-159.
- Valdezate, S., M. Arroyo, et al. (2007). "Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of Salmonella strains isolated from food for human consumption in Spain." J Food Prot **70**(12): 2741-2748.
- van Essen-Zandbergen, A., H. Smith, et al. (2007). "Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands." J Antimicrob Chemother **59**(4): 746-750.

- Veldman, K., L. M. Cavaco, et al. (2011). "International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries." J Antimicrob Chemother **66**(6): 1278-1286.
- Veldman, K., W. van Pelt, et al. (2008). "First report of qnr genes in *Salmonella* in The Netherlands." J Antimicrob Chemother **61**(2): 452-453.
- Vidal, A. (2005). Salmonelosis porcina: monitorización y bases para su control, PhD, Universidad de León.
- Vila, J. (2008). Epidemiology and Evolution of Quinolone Resistance. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. F. Baquero, C. Nombela et al. Washington, DC, ASM Press: 271-278.
- Vila, J. (2007). Quinolone resistance in the food chain. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/25th International Congress of Chemotherapy, Munich, GERMANY, Elsevier Science Bv.
- Vincentzen, U. and B. Hope (2006). Antibiotic Resistance. Brussels, ETAG-European Parliament: 89.
- Vo, A., E. van Duijkeren, et al. (2007). "A novel *Salmonella* genomic island 1 and rare integron types in *Salmonella* Typhimurium isolates from horses in The Netherlands." J Antimicrob Chemother **59**(4): 594-599.
- Vo, A. T., E. van Duijkeren, et al. (2006). "Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands." Int J Antimicrob Agents **28**(3): 172-179.
- Wagner, R. D. (2006). "Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products." Mol Nutr Food Res **50**(11): 1061-1071.
- Walsh, C. (2003). Antibiotics. Actions, origins, resistance. Washington, DC, ASM Press.
- Wang, H., J. L. Dzink-Fox, et al. (2001). "Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: Role of *acrR* mutations." Antimicrob Agents Chemother **45**(5): 1515-1521.

- Wang, M. H., Q. L. Guo, et al. (2009). "New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*." Antimicrob Agents Chemother **53**(5): 1892-1897.
- Wannaprasat, W., P. Padungtod, et al. (2011). "Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans." Int J Antimicrob Agents **37**(5): 457-461.
- Weill, F., F. Guesnier, et al. (2006). "Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003)." J Clin Microbiol **44**(3): 700-708.
- Weill, F. X., S. Bertrand, et al. (2006). "Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky in travelers." Emerg Infect Dis **12**(10): 1611-1612.
- Wernery, U. (1992). "The prevalence of *Salmonella* infections in camels (*Camelus dromedarius*) in the United Arab Emirates." Br Vet J **148**(5): 445-450.
- Whichard, J. M., F. Medalla, et al. (2010). "Evaluation of antimicrobial resistance phenotypes for predicting multidrug-resistant *Salmonella* recovered from retail meats and humans in the United States." J Food Prot **73**(3): 445-451.
- Whichard, J. M., K. Gay, et al. (2007). "Human salmonella and concurrent decreased susceptibility to Quinolones and extended-spectrum Cephalosporins." Emerg Infect Dis **13**: 1681-1688.
- White, D. G., S. Zhao, et al. (2003). "Characterization of integron mediated antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased swine." Can J Vet Res **67**(1): 39-47.
- White, P. A., C. J. McIver, et al. (2001). "Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae." Antimicrob Agents Chemother **45**(9): 2658-2661.
- White, P. A., C. J. McIver, et al. (2000). "Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*." FEMS Microbiol Lett **182**(2): 265-269.
- Wilhelm, B., A. Rajic, et al. (2009). "Prevalence of zoonotic or potentially zoonotic bacteria, antimicrobial resistance, and somatic cell counts in organic dairy production: current knowledge and research gaps." Foodborne Pathog Dis **6**(5): 525-539.

- Winokur, P. L., D. L. Vonstein, et al. (2001). "Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans." Antimicrob Agents Chemother **45**(10): 2716-2722.
- Woodford, N., E. J. Fagan, et al. (2006). "Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases." J Antimicrob Chemother **57**(1): 154-155.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nat Rev Microbiol **5**: 175-186.
- Wu, J. J., W. C. Ko, et al. (2008). "Emergence of Qnr determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan." J Antimicrob Chemother **62**(6): 1269-1272.
- Xia, S. L., R. S. Hendriksen, et al. (2009). "Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Isolates from Infections in Humans in Henan Province, China." J Clin Microbiol **47**(2): 401-409.
- Yamane, K., J. I. Wachino, et al. (2007). "New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate." Antimicrob Agents Chemother **51**(9): 3354-3360.
- Yang, B., J. Zheng, et al. (2009). "Characterisation of antimicrobial resistance-associated integrons and mismatch repair gene mutations in *Salmonella* serotypes." Int J Antimicrob Agents **33**(2): 120-124.
- Yang, B., M. Sheng, et al. (2008). "Identification of antimicrobial susceptibility of foodborne *Salmonella* and related plasmid." Wei sheng wu xue bao = Acta Microbiol Sinica **48**(8): 1006-1012.
- Yang, S. J., K. Y. Park, et al. (2002). "Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: Comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization." Vet Microbiol **86**(4): 295-301.
- Zhang, Q., O. Sahin, et al. (2006). "Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*." Microbes Infect **8**(7): 1972-1978.

Zhao, S., K. Blickenstaff, et al. (2009). "Beta-Lactam resistance in salmonella strains isolated from retail meats in the United States by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System between 2002 and 2006." *Appl Environ Microbiol* **75**(24): 7624-7630.

Anexos:

- Tablas de caracterización del cepario
- Dendogramas (PFGE)
- Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos testados

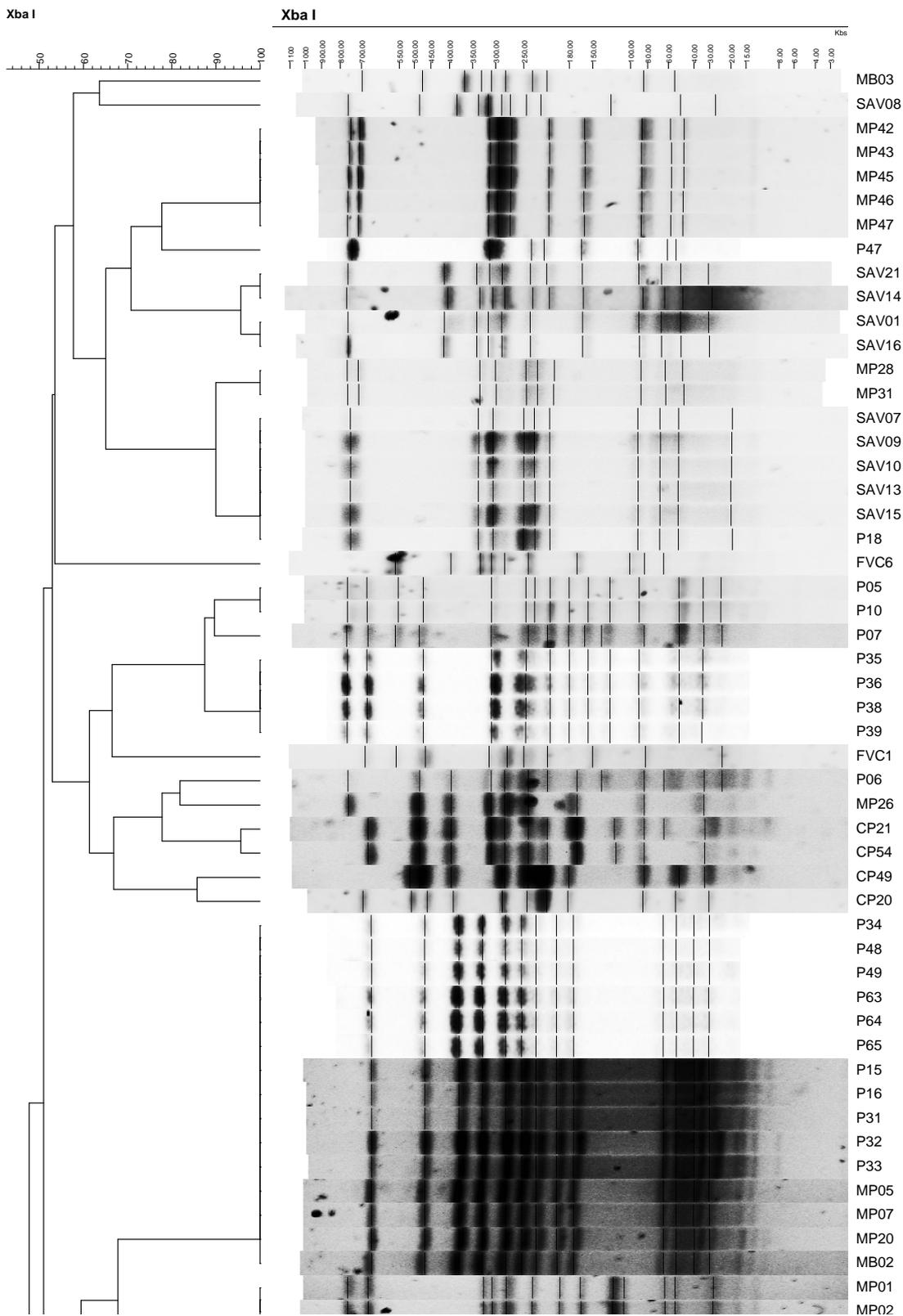
Cepa	UN	Año	Origen	Especie	Régimen	Muestra	Serovar	Fagotipo	PS	Fenotipo de Resistencia	gyrA	parC	blaTEM	blaOXA	int1	Perfil
FVC1	UCO	2008	Cáceres	Ovino	Sin dato	Explotación	4.12.i:-	NT	NT							
P12	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	4.5.12.i:-	U302	MO2	AMP-AMX-AMC-STR-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET				1	0	1
MP13	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	208	MO6	KAN-SUL-SXT-TMP-TET-CAF				0	0	0
MP21	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Recebo	Mataadero	4.5.12.i:-	193	MO1	STR-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-CAF				0	0	0
MP22	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Recebo	Mataadero	4.5.12.i:-	193	MO1	STR-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET				0	0	0
MP23	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Recebo	Mataadero	4.5.12.i:-	193	MO1	STR-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET				0	0	1
MP24	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Recebo	Mataadero	4.5.12.i:-	193	MO1	STR-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET				0	0	1
MP37	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Cebo	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO7	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SUL-SXT-TET				0	0	0
MP38	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Cebo	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO7	AMP-AMX-AMC-STR-GEN-SUL-SXT-TET				0	0	0
MP39	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Cebo	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO7	AMP-AMX-AMC-STR-GEN-SUL-SXT-TET				0	0	0
CP25	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO5	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-TET				0	0	0
CP26	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO5	AMP-AMX-AMC-STR-GEN-SUL-TET				0	0	0
CP27	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO5	AMP-AMX-AMC-STR-SXT-TET				0	0	0
CP30	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO4	AMP-AMX-AMC-STR-SXT-TET	0	0		0	0	0
CP32	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO4	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET				0	0	0
CP45	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO4	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-SXT-TET				0	0	0
CP58	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	U311	MO5	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-SXT-TET				0	0	0
C48	UCO	2003	Andalucía	Perdiz roja	Salvaje	Caso clínico	4.5.12.i:-	193	MO3	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-CAF-XNL-CTX-CFO-NAL-ENR-CIP	S83Y	0	1	0	1	H
C62	UCO	2005	Andalucía	Porcino ibérico	Extensivo	Caso clínico	4.5.12.i:-	193	MO8	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET				0	0	0
MP08	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	NT	NT					0	0	0
MP09	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	4.5.12.i:-	NT	NT	STR				0	0	0
C27	UCO	2001	Andalucía	Vacuno	Sin dato	Caso clínico	Abony	NT	NT	AMX-STR-TET				0	0	0
O06	UCO	1997	Andalucía	Ovino	Extensivo	Explotación	Abortusovis	AB1	AB1	AMP-AMX-SPT-SUL-SXT				0	0	0
O14	UCO	1998	Andalucía	Ovino	Extensivo	Explotación	Abortusovis	AB1	AB1	SUL				0	0	0
MB3	UCM	2007	Cáceres	Vacuno	Sin dato	Mataadero	Agona	NT	NT	AMX-KAN-SUL-SXT-TET-CAF				0	0	0
P51	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Anatum	AN1	AN1	AMP-AMX-AMC-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL				1	0	1
MP06	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	Anatum	AN11	AN11					0	0	0
MP44	UCM	2008	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	Anatum	AN2	AN2	AMP-KAN-SUL-TET				0	0	0
MP49	UCM	2008	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	Anatum	AN6	AN6	AMP-AMX-AMC-KAN-SUL-SXT-TMP				1	D	D
MA1	UCM	2005	Badajoz	Avicultura	Intensivo	Mataadero	Anatum	AN8	AN8	AMP				0	0	0
MA2	UCM	2005	Badajoz	Avicultura	Intensivo	Mataadero	Anatum	AN9	AN9					0	0	0
MA3	UCM	2005	Badajoz	Avicultura	Intensivo	Mataadero	Anatum	AN10	AN10					0	0	0
MA4	UCM	2005	Cáceres	Avicultura	Intensivo	Mataadero	Anatum	AN10	AN10					0	0	0
MA5	UCM	2005	Cáceres	Avicultura	Intensivo	Mataadero	Anatum	AN10	AN10	STR-TMP				0	0	0
MB1	UCM	2007	Cáceres	Vacuno	Sin dato	Mataadero	Anatum	AN10	AN10					0	0	0
CP52	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	Anatum	AN5	AN5	AMC-SUL				0	0	0
CP59	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	Anatum	AN5	AN5	AMP-SXT-TET				0	0	0
FVC3	UEX	2008	Cáceres	Cigüeña blanca	Salvaje	Caso clínico	Anatum	AN7	AN7					0	0	0
FVC5	UEX	2008	Cáceres	Cigüeña blanca	Salvaje	Caso clínico	Anatum	AN7	AN7					0	0	0
P05	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Brandenburg	BA1	BA1	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SXT-TMP-TET	0	T57S	1	1	1	I
P10	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Brandenburg	BA1	BA1	AMP-AMX-AMC-STR-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-CFO-CIP	0	T57S	1	0	1	I
P35	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Brandenburg	BA2	BA2	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	T57S	1	1	1	D
P36	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Brandenburg	BA2	BA2	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	T57S	1	1	1	D
P38	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Brandenburg	BA2	BA2	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	T57S	1	1	1	D
P39	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Brandenburg	BA2	BA2	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	T57S	1	1	1	D
P06	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Bredenej	BE5	BE5	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL	1	0	1	0	1	E
P07	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Mataadero	Bredenej	BE6	BE6	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	1	0	1	1	1	D
MP26	UCM	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Cebo	Mataadero	Bredenej	BE3	BE3	STR-KAN-GEN				0	0	0
CP21	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	Bredenej	BE6	BE6	SUL-TET				0	0	0
CP49	UCO	2007	Badajoz	Porcino ibérico	Montanera	Mataadero	Bredenej	BE7	BE7	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET				0	0	0

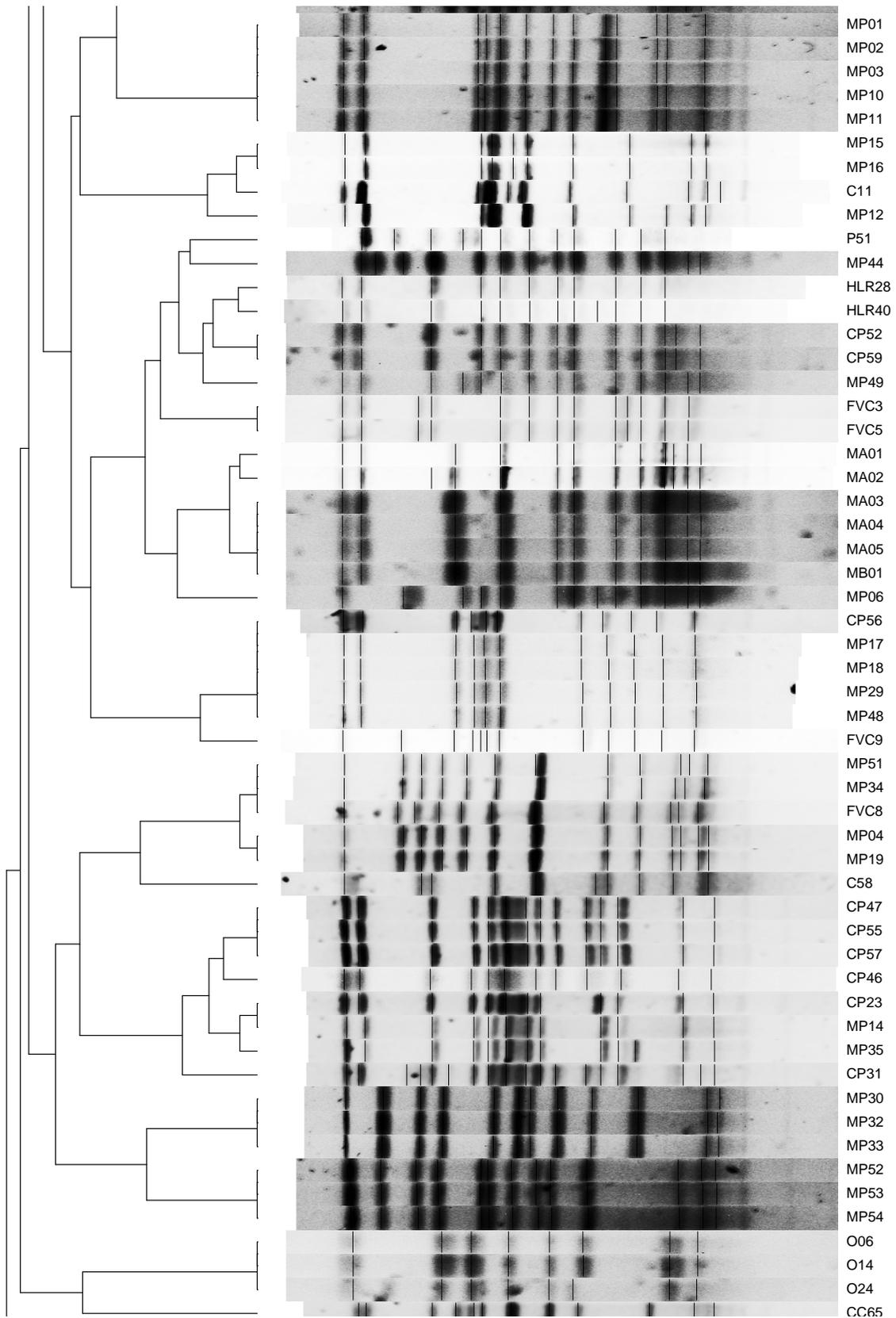
Capa	UN	Año	Origen	Especie	Régimen	Muestra	Serovar	Fagotipo	PS	Fenotipo de Resistencia	gyrA	parC	blaTEM	blaOXA	int1	Perfil
CP54	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Bredeneby		BE11							0
FVC6	UEX	2008	Cáceres	Ciguñeta blanca	Salvaje	Caso clínico	Bredeneby		BE9							0
C58	UCO	2005	Andalucía	Jabali	Salvaje	Caso clínico	Choleraesuis		CH3	AMP-AMC-STR-GEN-TMP-TET-XNL-NAL-ENR	0	0	0	0	0	0
MP04	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Choleraesuis		CH1	AMP-AMX-STR-SUL-SXT-TMP-TET						0
MP19	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Choleraesuis		CH1	AMP-AMX-STR-SUL-SXT-TMP-TET						0
MP51	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Choleraesuis		CH2	AMP-AMX-STR-SUL-SXT-TMP-TET-CEF						0
MP34	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Choleraesuis		NT	STR-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET						1
FVC8	UEX	2008	Cáceres	Porcino blanco	Intensivo	Caso clínico	Choleraesuis		CH2	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TMP-TET						1
MP14	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Derby		DE3	STR-SPT-SUL-SXT-TET-CAZ	0	T57S	0	0	0	0
MP35	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Derby		DE4	STR-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TET						1
CP20	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Derby		DE2	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-TET						1
CP23	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Derby		DE3	STR-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TET						1
CP31	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Derby		DE8	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET						0
CP47	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Derby		DE5	TET						0
CP55	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Derby		DE5	TET						0
CP57	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Derby		DE5	NEO-TET						0
CP65	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Extensivo	Caso clínico	Derby		DE7	STR-NEO-KAN-APR-SPT-CHL-FLR-SXT-TMP-TET						0
CP46	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Derby		DE9	AMP-AMX-AMC-SUL-SXT-TMP-TET						0
C11	UCO	1998	Andalucía	Jabali	Salvaje	Caso clínico	Enteritidis		EN01	AMP-AMX-AMC-STR-GEN-SPT-TET-NAL-CIP	0	0	0	0	0	0
C01	UCO	1997	Andalucía	Gallina huevo	Sin dato	Caso clínico	Enteritidis		35	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SXT-TET						0
C30	UCO	2002	Andalucía	Pitón	Compañía	Caso clínico	Enteritidis		EN3	AMP-AMX-AMC-GEN-SUL-SXT-CEF						0
SAV02	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación polvo	Enteritidis		7	AMP-AMC-STR-GEN-TMP-TET-CTX-NAL-ENR-CIP		D87Y	0	0	0	0
SAV03	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Enteritidis		EN2							0
SAV04	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Enteritidis		NT	NEO-GEN-SXT-CFQ						0
SAV05	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Enteritidis		EN2	GEN-TMP-CFQ-NAL-ENR-CIP		D87Y	0	0	0	0
SAV06	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Caso clínico polvo	Enteritidis		4	CTX-CFQ						0
SAV11	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Matajero caldo	Enteritidis		PNR	AMP-NEO-KAN-SUL-SXT-NAL-ENR-CIP		D87Y	0	0	0	0
SAV17	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Enteritidis		EN2	SXT-NAL-ENR-CIP		D87Y	0	0	0	0
SAV18	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Enteritidis		35	NAL-CIP		D87Y	0	0	0	0
SAV19	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Enteritidis		1	NEO-KAN-GEN		D87Y	0	0	0	0
SAV20	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Enteritidis		1	KAN-GEN						0
FVC4	UEX	2008	Cáceres	Ciguñeta blanca	Salvaje	Caso clínico	Enteritidis		1	NAL-ENR-CIP		S83F	0	0	0	0
MP12	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Recebo	Matajero	Essen		ES2							0
MP15	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Essen		ES1	SPT-SXT-CAZ-NAL-ENR-CIP		D87Y	0	0	0	0
MP16	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Essen		ES1	SXT-NAL-ENR-CIP		D87Y	0	0	0	0
P47	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Goldcoast		NT	AMP-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TMP-TET-XNL						0
P18	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Hadar		2	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-SUL-TMP-TET-CFQ-NAL-ENR-CIP		D87N	T57S	0	0	0
SAV07	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Matajero caldo	Hadar		2	STR-NEO-CFQ-NAL-ENR-CIP		D87N	T57S	0	0	0
SAV09	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación polvo	Hadar		2	STR-NEO-KAN-GEN-SUL-TET-NAL-ENR-CIP		D87N	T57S	0	0	0
SAV10	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación polvo	Hadar		15	STR-KAN-SUL-TET-NAL-ENR-CIP		D87N	T57S	0	0	0
SAV13	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación polvo	Hadar		1	STR-NEO-KAN-TET-NAL-ENR-CIP		D87N	T57S	0	0	0
SAV15	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación polvo	Hadar		15	STR-NEO-KAN-TET-NAL-ENR-CIP		D87N	T57S	0	0	0
MP42	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Hindmarsh		H11	KAN-SXT-NAL-CIP						1
MP43	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Hindmarsh		H11	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-CHL-SUL-SXT-TMP-TET						1
MP45	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Hindmarsh		H11	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-CHL-SUL-SXT-TMP-TET						1
MP46	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Hindmarsh		H11	AMP-AMX-AMC-STR-GEN-SUL-SXT-TMP-TET						1
MP47	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Hindmarsh		H11	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-CHL-SUL-SXT-TMP-TET						1
MP48	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montañera	Matajero	Hindmarsh		H11	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-CHL-SUL-SXT-TMP-TET						1
C36	UCO	2002	Andalucía	Varano	Compañía	Caso clínico	Illb.47:k:z35		NT	CHL-SUL-CIP		0				0
SAV01	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Infantis		IN3	GEN						0
SAV16	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Infantis		IN3	KAN-GEN-NAL-CIP		0	T57S	0	0	0
SAV21	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Infantis		IN1	NEO-KAN						0

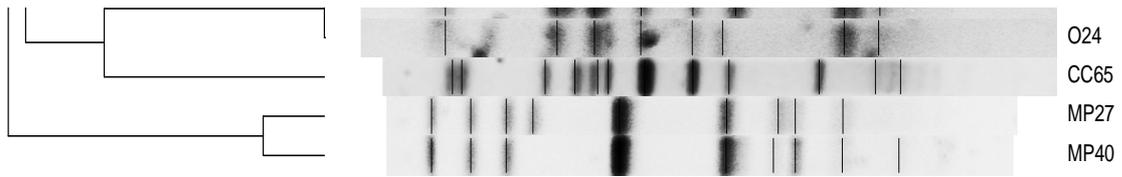
Cepa	UN	Año	Origen	Especie	Régimen	Muestra	Serovar	Fagotipo	PS	Fenotipo de Resistencia	gyrA	parC	blaTEM	blaOXA	int1	Perfil
SAV14	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación heces	Infantis	IN1	IN1	NEO-KAN-GEN-SXT-NAL-CIP	0	T5/S	0	0	0	0
MP28	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Istanbul	IS1	IS1	STR-GEN-NAL-ENR-CIP	D87N	T5/S	0	0	0	0
MP31	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Istanbul	IS1	IS1	STR-KAN-GEN-TET-NAL-ENR-CIP	D87N	T5/S	0	0	0	1
MP27	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	London	LO1	LO1	GEN	0	0	0	0	0	0
MP40	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	London	LO1	LO1	AMP-GEN	0	0	0	0	0	0
CP56	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Mikavassima	M11	M11	TET	0	0	0	0	0	0
MP17	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Mikavassima	M11	M11	GEN-APR-NAL	0	0	0	0	0	0
MP18	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Mikavassima	M11	M11	GEN	0	0	0	0	0	1
MP29	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Mikavassima	M11	M11	SXT	0	0	0	0	0	0
MP48	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Mikavassima	M11	M11	KAN-GEN	0	0	0	0	0	0
FVC9	UEX	2008	Badajoz	Buitre negro	Salvaje	Caso clínico	Mikavassima	M12	M12	AMP-AMX-AMC-SPT-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	0
MP01	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Mikavassima	MN1	MN1	GEN	0	0	0	0	0	1
MP02	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Montevideo	MN1	MN1	GEN	0	0	0	0	0	0
MP03	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Montevideo	MN1	MN1	GEN	0	0	0	0	0	0
MP10	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Recebo	Matajero	Montevideo	MN1	MN1	GEN	0	0	0	0	0	0
MP11	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Recebo	Matajero	Montevideo	MN1	MN1	CAZ	0	0	0	0	0	0
SAV08	UCO	2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Explotación polvo	Othmarschen	OT	OT	KAN-GEN-SUL-NAL-CIP	0	T5/S	0	0	0	0
P15	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
P16	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-SXT-TMP-TET	0	T5/S	0	0	0	0
P31	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-NEO-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TET-CFQ	0	0	0	0	0	0
P32	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	1
P33	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL-CFQ	0	0	0	0	0	1
P34	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-CEF	0	0	0	0	0	1
P48	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TET-CEF-XNL-CFQ	1	0	0	0	0	1
P49	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TMP-TET-XNL-CFQ	0	0	0	0	0	1
P63	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-CEF-XNL	0	0	0	0	0	1
P64	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-CEF-XNL	0	0	0	0	0	1
P65	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TMP-TET-CEF-XNL-CTX	1	0	0	0	0	1
MP05	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Rissen	R11	R11	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TMP-TET-CTX	0	0	0	0	0	1
MP07	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Rissen	R11	R11	GEN-TET	0	0	0	0	0	0
MP20	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Rissen	R11	R11	TET	0	0	0	0	0	0
MB2	UCM	2007	Cáceres	Vacuno	Sin dato	Matajero	Rissen	R11	R11	KAN-TET	0	0	0	0	0	0
MP30	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Rissen	R11	R11	NEO-KAN-TET	0	0	0	0	0	0
MP32	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Tomegbe	TO1	TO1	GEN	0	0	0	0	0	0
MP33	UCM	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matajero	Tomegbe	TO1	TO1	GEN-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
MP52	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Tomegbe	TO2	TO2	GEN	0	0	0	0	0	0
MP53	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Tomegbe	TO2	TO2	KAN-GEN	0	0	0	0	0	0
MP54	UCM	2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Tomegbe	TO2	TO2	STR-KAN-GEN	0	0	0	0	0	0
CP68	UCO	2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matajero	Tomegbe	TY4	TY4	KAN-SXT	0	0	0	0	0	0
P03	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-STR-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	0
P09	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TET-CFQ	1	0	0	0	0	1
P11	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	NT	TY36	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TET-CTX-CFO	0	0	0	0	0	1
P13	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	U311	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	1
P19	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	U302	TY13	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-NAL-CIP	0	0	0	0	0	1
P21	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SPT-CHL-SUL-TET-CTX-CFO-NAL-CIP	0	0	0	0	0	1
P22	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SPT-CHL-SUL-TET-CTX-CFO	0	0	0	0	0	1
P23	UCO	2003	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-SPT-CHL-SUL-TET-CTX-CFO	0	0	0	0	0	1
P24	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	NT	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-TET-CTX-CFO	0	0	0	0	0	1
P25	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SPT-CHL-SUL-TET-CTX-CFO	0	0	0	0	0	1
P26	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SPT-CHL-SUL-TET-CTX-CFO-CIP	0	0	0	0	0	1
P27	UCO	2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matajero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SPT-CHL-SUL-TET-CTX-CFO	0	0	0	0	0	1

Cepa	Año	Origen	Especie	Régimen	Muestra	Serovar	Fagotipo	PS	Fenotipo de Resistencia	gVA	parc	blaTEM	blaOXA	int1	Perfil
P29	UCO 2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matadero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-STR-CHL-SUL-SXT-TET-CFQ	0	1	1	1	1	A
P30	UCO 2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matadero	Typhimurium	104b	TY09	AMP-AMX-AMC-KAN-SPT-CHL-SUL-SXT-TET-CTX-CAZ-CFQ	0	1	1	1	1	A
P50	UCO 2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matadero	Typhimurium	104b	TY16	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-NEO-GEN-SPT-SUL-SXT-TMP-TET-XNL	0	1	1	1	1	A
P57	UCO 2004	Andalucía	Porcino blanco	Intensivo	Matadero	Typhimurium	29	TY47	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL-CTX-CFQ-NAL-ENR-CIP	S83Y	0	1	0	1	F
C03	UCO 1997	Andalucía	Canario	Compañía	Caso clínico	Typhimurium	104b	TY48	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	1	B
C04	UCO 1997	Andalucía	Canario	Compañía	Caso clínico	Typhimurium	104	TY43	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	1	B
C06	UCO 1998	Andalucía	Canario	Compañía	Caso clínico	Typhimurium	104b	TY34	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	1	B
C07	UCO 1998	Andalucía	Codorniz	Salvaje	Caso clínico	Typhimurium	104b	TY34	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	1	B
C19	UCO 2000	Andalucía	Perdiz roja	Salvaje	Caso clínico	Typhimurium	U302	TY43	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TET-NAL-ENR-CIP	0	0	0	0	1	B
C29	UCO 2002	Andalucía	Perdiz roja	Salvaje	Caso clínico	Typhimurium	204c	TY78	NEO	S83Y	0	1	0	1	G
C38	UCO 2002	Andalucía	Perdiz roja	Salvaje	Caso clínico	Typhimurium	204a	TY15	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-CEF-XNL-CTX-CFQ-NAL-ENR-CIP	S83Y	0	1	0	1	G
C46	UCO 2003	Andalucía	Equino	Sin dato	Caso clínico	Typhimurium	15a	TY68	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-NAL-ENR	0	0	0	0	0	0
C49	UCO 2003	Andalucía	Porcino	Sin dato	Caso clínico	Typhimurium	U302	TY13	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TET-NAL-ENR	0	0	0	0	1	1
C50	UCO 2004	Andalucía	Porcino	Sin dato	Caso clínico	Typhimurium	U302	TY13	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TET-NAL	0	0	0	0	1	1
C51	UCO 2004	Andalucía	Equino	Sin dato	Caso clínico	Typhimurium	U302	TY13	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
C54	UCO 2004	Andalucía	Perdiz roja	Salvaje	Caso clínico	Typhimurium	193	TY48	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL-CTX-CFQ-NAL-ENR-CIP	S83Y	0	1	0	1	F
C56	UCO 2004	Andalucía	Perdiz roja	Salvaje	Caso clínico	Typhimurium	204a	TY48	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-XNL-CTX-CFQ-NAL-ENR-CIP	S83Y	0	1	0	1	F
SAV12	UCO 2007	Andalucía	Avicultura	Intensivo	Matadero caído	Typhimurium	NT	TY66	AMP-AMX-AMC-NEO-KAN-GEN-SUL-SXT-TMP-TET-NAL-ENR-CIP	0	T57S	0	0	1	D
MP25	UCM 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matadero	Typhimurium	137	TY32	GEN	0	0	0	0	0	0
MP36	UCM 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Cebo	Matadero	Typhimurium	193	TY13	AMP-AMX-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-CUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
MP41	UCM 2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	NT	TY58	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-SPT-SUL-SXT-TET-XNL-CFQ	0	0	0	1	1	A
MP50	UCM 2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY13	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SPT-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
MP55	UCM 2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY65	AMP-AMX-AMC-STR-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CP01	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY26	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP02	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY11	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP03	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY11	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP04	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY11	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP05	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY11	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP06	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	NT	TY05	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP19	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY62	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	0
CP22	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY62	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CP24	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY65	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CP28	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY65	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CP29	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY65	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CP44	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	40	TY32	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CP48	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY65	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CP50	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY65	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CP51	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY62	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TET-XNL	0	0	0	0	0	0
CP60	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY25	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP61	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY13	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP64	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY03	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	1	1
CP67	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY67	AMP-AMX-AMC-STR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET-CTX	0	0	0	0	1	1
CP68	UCO 2007	Badajoz	Porcino Ibérico	Montanera	Matadero	Typhimurium	193	TY64	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	0
CG63	UCO 2005	Andalucía	Porcino Ibérico	Extensivo	Caso clínico	Typhimurium	203	TY13	AMP-AMX-AMC-STR-KAN-GEN-SPT-CHL-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0
CG64	UCO 2006	Andalucía	Porcino Ibérico	Extensivo	Caso clínico	Typhimurium	U310	TY63	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-GEN-APR-CHL-FLR-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	0
CG66	UCO 2007	Andalucía	Porcino Ibérico	Extensivo	Caso clínico	Typhimurium	NT	TY53	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-APR-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TMP-TET-CEF	0	0	0	0	0	0
CG67	UCO 2008	Badajoz	Porcino Ibérico	Extensivo	Caso clínico	Typhimurium	NT	TY77	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-APR-SPT-CHL-FLR-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	0
CG68	UCO 2008	Andalucía	Porcino Ibérico	Extensivo	Caso clínico	Typhimurium	193	TY64	AMP-AMX-AMC-STR-NEO-KAN-APR-SPT-CHL-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	0
FVC2	UEX 2008	Cáceres	Halcón	Salvaje	Caso clínico	Typhimurium	195	TY02	AMP-AMX-AMC-STR-SUL-SXT-TMP-TET	0	0	0	0	0	0
FVC7	UEX 2008	Cáceres	Cigüeta blanca	Salvaje	Caso clínico	Typhimurium	195	TY19	AMP-AMX-AMC-STR-GEN-SUL-SXT-TET	0	0	0	0	0	0

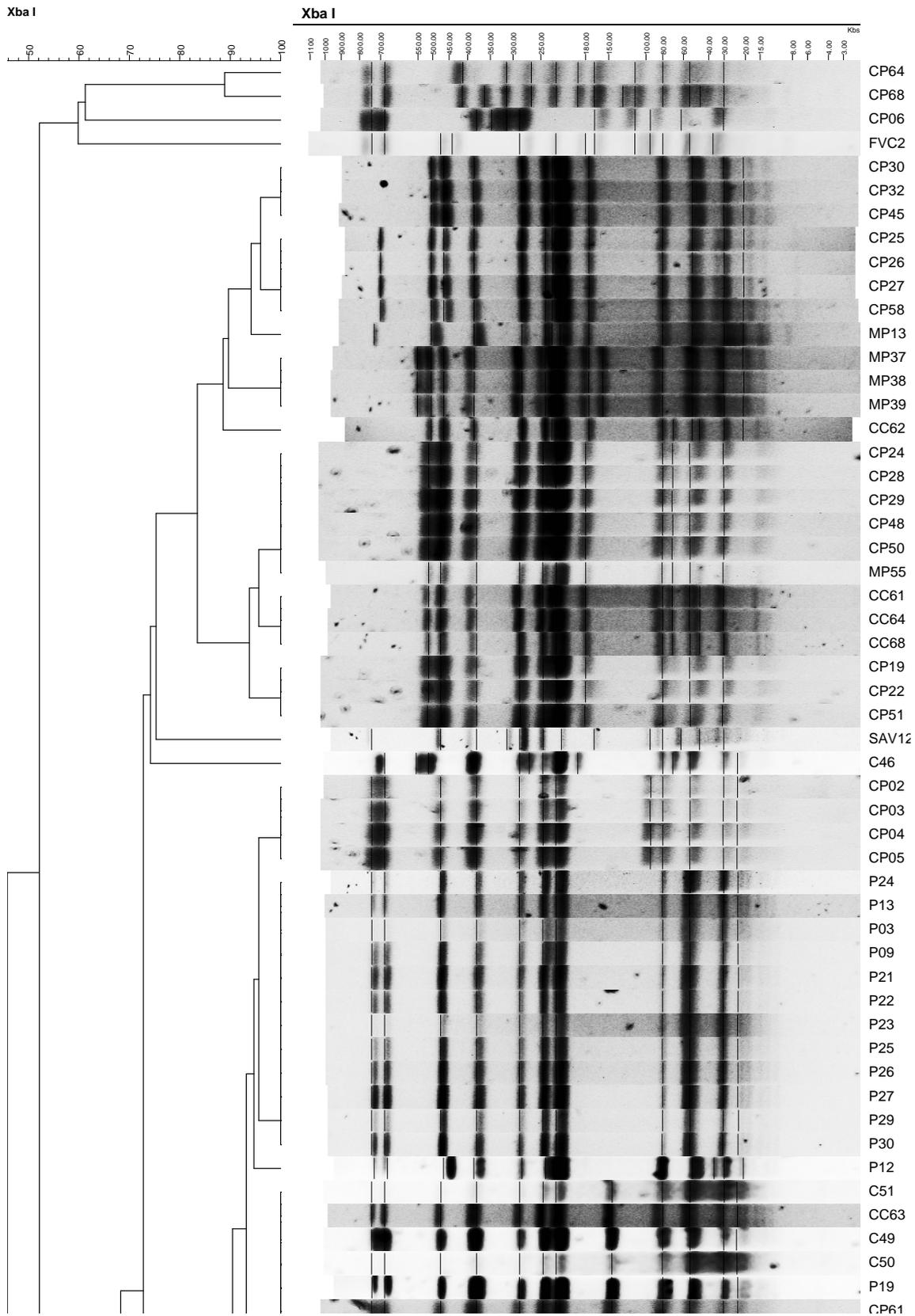
Dendograma de las cepas de los serotipos Typhimurium y 4,5,12:i:-

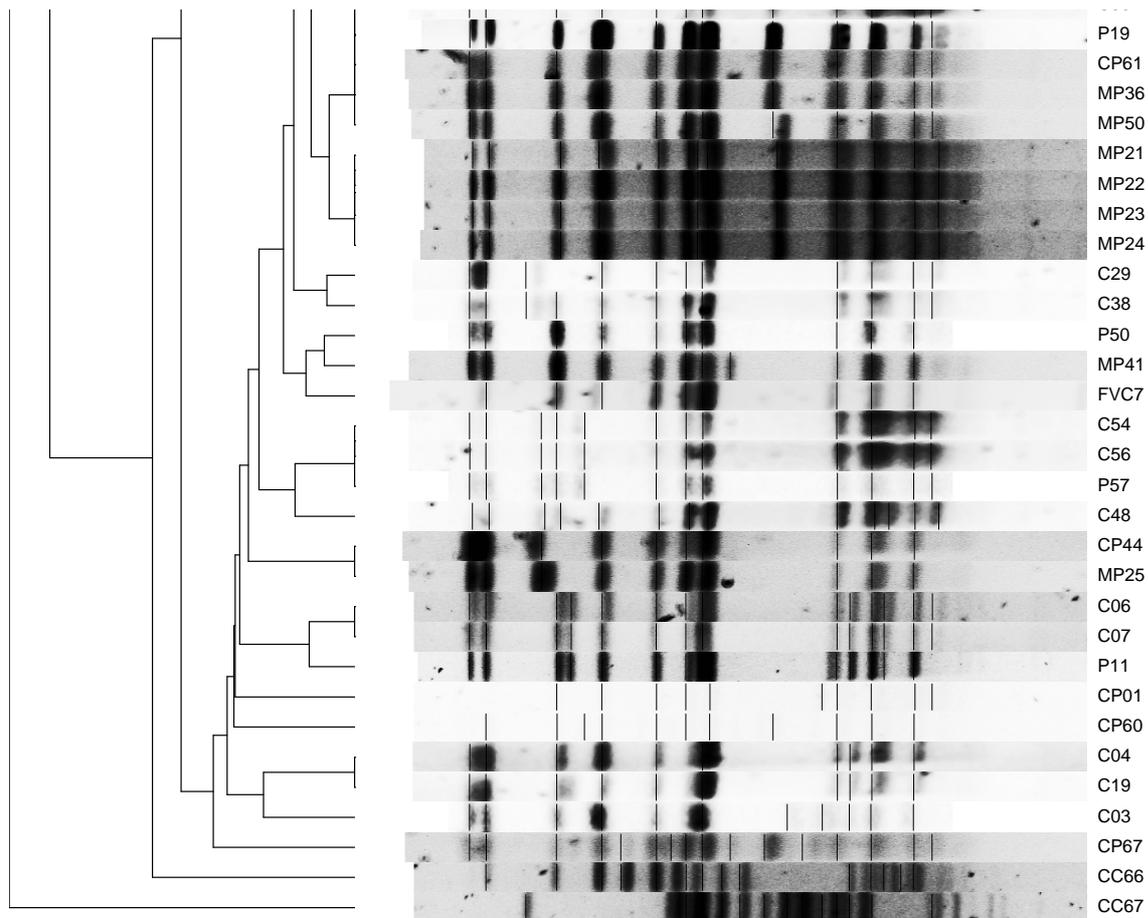






Dendrograma de las cepas del resto de serotipos.





Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Streptomicina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	32->512	>512	>512	>512	94,12
Anatum	13	16-64	32	32	32	7,69
Choleraesuis	6	64-256	128	128	256	100
Derby	10	16->512	128	256	>512	60
Enteritidis	14	4-128	16	16	128	21,43
Mikawasima	6	16-32	16	32	32	0
Otros	45	4->512	32	128	>512	33,33
Tomegbe	6	16-64	16	32	64	16,67
Typhimurium	47	8->512	512	>512	>512	87,23
Subtotal	164	4->512	128	512	>512	54,27
Brandenburg	6	64-256	64	256	256	100
Otros	6	32->512	512	>512	>512	83,33
Rissen	11	8->512	64	128	512	72,73
Typhimurium	16	8->512	128	128	>512	62,5
Subtotal	39	8->512	64	256	>512	74,36
TOTAL	203	4->512	128	512	>512	58,13

WT≤32

Neomicina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	4-512	4	4	8	11,76
Anatum	13	4	4	4	4	0
Choleraesuis	6	4	4	4	4	0
Derby	10	2-8	4	4	8	20
Enteritidis	14	2-128	4	4	8	21,43
Mikawasima	6	2-4	4	4	4	0
Otros	45	2-128	4	4	8	20
Tomegbe	6	4	4	4	4	0
Typhimurium	47	2->512	4	4	8	21,28
Subtotal	164	2->512	4	4	8	15,85
Brandenburg	6	4->512	128	>512	>512	66,66
Otros	6	4-16	8	8	16	66,66
Rissen	11	4-64	8	8	16	54,55
Typhimurium	16	4-256	4	8	32	37,5
Subtotal	39	4->512	8	16	>512	51,28
TOTAL	203	2->512	4	4	8	22,66

WT≤4

Kanamicina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	2->512	4	4	8	23,53
Anatum	13	4-8	4	4	8	15,38
Choleraesuis	6	4	4	4	4	0,00
Derby	10	2-16	4	4	8	30,00
Enteritidis	14	2->512	4	4	16	28,57
Mikawasima	6	4-8	4	8	8	16,67
Otros	45	2-16	4	8	8	35,56
Tomegbe	6	4-8	4	8	8	50,00
Typhimurium	47	2->512	4	8	>512	46,81
Subtotal	164	2->512	4	8	16	33,54
Brandenburg	6	4->512	100	100	100	83,33
Otros	6	4->512	8	32	>512	83,33
Rissen	11	4-512	8	8	16	81,82
Typhimurium	16	2->512	8	8	8	75,00
Subtotal	39	2->512	8	8	>512	79,49
TOTAL	203	2->512	4	8	16	42,36

WT≤4

Gentamicina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	≤0,13-256	4	4	4	52,94
Anatum	13	1-2	2	2	2	0,00
Choleraesuis	6	2-32	2	4	32	33,33
Derby	10	0,5-4	2	2	4	20,00
Enteritidis	14	1-32	2	4	32	50,00
Mikawasima	6	1-4	2	4	4	50,00
Otros	45	0,5-4	2	4	4	31,11
Tomegbe	6	2-4	4	4	4	83,33
Typhimurium	47	≤0,13-128	2	4	16	31,91
Subtotal	164	≤0,13-256	2	4	4	34,76
Brandenburg	6	4-128	64	128	128	100,00
Otros	6	2-64	4	32	64	83,33
Rissen	11	1-4	4	4	4	54,55
Typhimurium	16	1-128	2	4	64	37,50
Subtotal	39	1-128	4	32	64	58,97
TOTAL	203	≤0,13-256	2	4	8	39,41

WT≤2

Apramicina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	2-8	4	8	8	0,00
Anatum	13	2-4	4	4	4	0,00
Choleraesuis	6	4	4	4	4	0,00
Derby	10	2-512	4	4	8	10,00
Enteritidis	14	2-4	4	4	4	0,00
Mikawasima	6	2-16	4	8	16	16,67
Otros	45	2-8	4	4	8	0,00
Tomegbe	6	4-8	4	8	8	0,00
Typhimurium	47	2->512	4	4	8	6,38
Subtotal	164	2->512	4	4	8	3,05
Brandenburg	6	8->512	>512	>512	>512	83,33
Otros	6	4->512	8	>512	>512	50,00
Rissen	11	4-16	4	8	8	9,09
Typhimurium	16	4->512	4	8	>512	12,50
Subtotal	39	4->512	8	128	>512	28,21
TOTAL	203	2->512	4	4	8	7,88

WT≤8

Espectinomicina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	32->512	64	>512	>512	29,41
Anatum	13	64-256	64	64	128	0,00
Choleraesuis	6	64->512	64	>512	>512	33,33
Derby	10	64->512	128	>512	>512	40,00
Enteritidis	14	32->512	64	64	256	7,14
Mikawasima	6	64-512	64	128	512	0,00
Otros	45	32-512	64	128	128	0,00
Tomegbe	6	32-256	32	64	256	0,00
Typhimurium	47	8->512	>512	>512	>512	57,45
Subtotal	164	8->512	64	512	>512	23,78
Brandenburg	6	>512	>512	>512	>512	100,00
Otros	6	256->512	>512	>512	>512	66,67
Rissen	11	16->512	>512	>512	>512	54,55
Typhimurium	16	>512	>512	>512	>512	100,00
Subtotal	39	16->512	>512	>512	>512	82,05
TOTAL	203	8->512	128	>512	>512	34,98

WT≤256

Cloranfenicol

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	2-512	4	32	32	29,41
Anatum	13	2-4	2	2	4	0,00
Choleraesuis	6	2-32	2	4	32	16,67
Derby	10	4-256	4	4	4	10,00
Enteritidis	14	2-16	4	8	16	0,00
Mikawasima	6	2-4	2	4	4	0,00
Otros	45	1-256	4	4	256	13,33
Tomegbe	6	1-4	2	2	4	0,00
Typhimurium	47	2->512	32	128	256	51,06
Subtotal	164	1->512	4	16	128	22,56
Brandenburg	6	64-512	256	512	512	100,00
Otros	6	4-256	4	128	256	50,00
Rissen	11	4-512	8	512	512	45,45
Typhimurium	16	8->512	256	256	>512	81,25
Subtotal	39	4->512	256	256	512	69,23
TOTAL	203	1->512	4	32	256	31,53

WT≤16

Florfenicol

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	4-16	4	8	8	0,00
Anatum	13	4	4	4	4	0,00
Choleraesuis	6	4-8	4	8	8	0,00
Derby	10	4-128	8	8	8	10,00
Enteritidis	14	4-8	4	4	8	0,00
Mikawasima	6	4	4	4	4	0,00
Otros	45	2-8	4	4	4	0,00
Tomegbe	6	2-4	4	4	4	0,00
Typhimurium	47	2-256	8	16	32	14,89
Subtotal	164	2-256	4	8	8	4,88
Brandenburg	6	16	16	16	16	0,00
Otros	6	4-8	8	8	8	0,00
Rissen	11	4-16	8	8	8	0,00
Typhimurium	16	4-16	4	8	8	0,00
Subtotal	39	4-16	8	8	16	0,00
TOTAL	203	2-256	4	8	16	3,94

WT≤16

Ampicilina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,5-256	128	256	256	70,59
Anatum	13	0,5-128	2	16	64	30,77
Choleraesuis	6	2-256	64	256	256	83,33
Derby	10	0,25-256	0,5	128	256	30,00
Enteritidis	14	0,5-256	1	2	256	21,43
Mikawasima	6	0,5-64	0,5	0,5	64	16,67
Otros	45	0,25-256	0,5	1	256	17,78
Tomegbe	6	0,5-2	0,5	2	2	0,00
Typhimurium	47	0,25-256	256	256	256	87,23
Subtotal	164	0,25-256	2	256	256	46,95
Brandenburg	6	>512	>512	>512	>512	100,00
Otros	6	2->512	>512	>512	>512	83,33
Rissen	11	64->512	>512	>512	>512	100,00
Typhimurium	16	128->512	>512	>512	>512	100,00
Subtotal	39	2->512	>512	>512	>512	97,44
TOTAL	203	0,25->512	64	256	>512	56,65

WT≤4

Amoxicilina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	1->512	>512	>512	>512	70,59
Anatum	13	0,5->512	0,5	0,5	1	7,69
Choleraesuis	6	1->512	512	>512	>512	66,67
Derby	10	0,5->512	1	>512	>512	30,00
Enteritidis	14	0,5->512	1	128	>512	35,71
Mikawasima	6	0,5-512	1	2	512	16,67
Otros	45	0,5->512	0,5	1	>512	20,00
Tomegbe	6	0,5-1	0,5	1	1	0,00
Typhimurium	47	0,5->512	>512	>512	>512	87,23
Subtotal	164	0,5->512	1	>512	>512	46,34
Brandenburg	6	>512	>512	>512	>512	100,00
Otros	6	>512	>512	>512	>512	100,00
Rissen	11	0,25->512	>512	>512	>512	81,82
Typhimurium	16	8->512	>512	>512	>512	100,00
Subtotal	39	0,25->512	>512	>512	>512	94,87
TOTAL	203	0,25->512	>512	>512	>512	55,67

WT≤4

Amoxicilina+clavulanato

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,5-256	32	256	256	70,59
Anatum	13	0,5-128	0,5	0,5	16	15,38
Choleraesuis	6	0,5-64	0,5	8	64	33,33
Derby	10	0,13-256	0,5	128	256	30,00
Enteritidis	14	1-64	1	8	8	28,57
Mikawasima	6	0,5-32	0,5	0,5	32	16,67
Otros	45	0,5-256	1	1	32	13,33
Tomegbe	6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,00
Typhimurium	47	0,5-512	32	256	256	82,98
Subtotal	164	0,13-512	1	32	256	42,07
Brandenburg	6	8-64	8	64	64	100,00
Otros	6	1-64	8	8	64	83,33
Rissen	11	1-8	8	8	8	72,73
Typhimurium	16	8-64	64	64	64	100,00
Subtotal	39	1-64	8	64	64	89,74
TOTAL	203	0,13-512	8	64	256	51,23

WT≤4

Cefalotina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	1-64	4	8	16	5,88
Anatum	13	2-4	2	2	2	0,00
Choleraesuis	6	2-64	8	64	64	33,33
Derby	10	1-32	2	4	4	0,00
Enteritidis	14	2-256	2	4	16	7,14
Mikawasima	6	1-4	2	2	4	0,00
Otros	45	0,25-8	2	2	4	0,00
Tomegbe	6	1-2	2	2	2	0,00
Typhimurium	47	1-64	4	8	32	4,26
Subtotal	164	0,25-256	2	4	16	3,66
Brandenburg	6	16-32	32	32	32	0,00
Otros	6	2-32	8	16	32	0,00
Rissen	11	2-64	32	64	64	36,36
Typhimurium	16	4-32	8	8	32	0,00
Subtotal	39	2-64	16	32	64	10,26
TOTAL	203	0,25-256	4	8	32	4,93

WT≤32

Ceftiofur

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,5-4	1	2	2	5,88
Anatum	13	0,25-2	1	1	1	0,00
Choleraesuis	6	0,5-4	1	1	4	16,67
Derby	10	0,5-2	1	2	2	0,00
Enteritidis	14	0,13-1	0,5	1	1	0,00
Mikawasima	6	1-2	1	1	2	0,00
Otros	45	0,25-2	0,5	1	2	0,00
Tomegbe	6	1	1	1	1	0,00
Typhimurium	47	0,06-8	1	2	4	12,77
Subtotal	164	0,06-8	1	1	2	4,88
Brandenburg	6	1-2	1	2	2	0,00
Otros	6	0,5-4	1	4	4	50,00
Rissen	11	1-4	2	4	4	45,45
Typhimurium	16	0,5-16	2	4	8	31,25
Subtotal	39	0,5-16	2	4	4	33,33
TOTAL	203	0,06-16	1	2	4	10,34

WT≤2

Cefotaxima

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,13-1	0,13	0,13	0,25	5,88
Anatum	13	0,06-0,25	0,13	0,13	0,13	0,00
Choleraesuis	6	0,13-0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
Derby	10	0,13-0,25	0,13	0,25	0,25	0,00
Enteritidis	14	0,06-1	0,13	0,25	1	14,29
Mikawasima	6	0,13-0,25	0,13	0,25	0,25	0,00
Otros	45	0,03-0,5	0,13	0,13	0,25	0,00
Tomegbe	6	0,13	0,13	0,13	0,13	0,00
Typhimurium	47	0,03-4	0,13	0,25	0,5	8,51
Subtotal	164	0,03-4	0,13	0,13	0,25	4,27
Brandenburg	6	0,13-0,5	0,13	0,25	0,5	0,00
Otros	6	0,06-0,25	0,13	0,25	0,25	0,00
Rissen	11	0,13-1	0,25	0,5	1	18,18
Typhimurium	16	0,13-2	2	2	2	68,75
Subtotal	39	0,06-2	0,25	1	2	33,33
TOTAL	203	0,03-4	0,13	0,25	0,5	9,85

WT≤0,5

Ceftazidima

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	1-4	2	2	4	11,76
Anatum	13	0,5-2	2	2	2	0,00
Choleraesuis	6	0,5-2	0,5	2	2	0,00
Derby	10	2-4	2	4	4	10,00
Enteritidis	14	0,03-1	0,5	0,5	1	0,00
Mikawasima	6	1-2	2	2	2	0,00
Otros	45	0,25-4	2	2	2	6,67
Tomegbe	6	0,06-2	0,5	2	2	0,00
Typhimurium	47	0,25-2	2	2	2	0,00
Subtotal	164	0,03-4	2	2	2	3,66
Brandenburg	6	0,5-1	1	1	1	0,00
Otros	6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,00
Rissen	11	0,5-2	1	1	2	0,00
Typhimurium	16	0,5-4	0,5	1	2	6,25
Subtotal	39	0,5-4	0,5	1	2	2,56
TOTAL	203	0,03-4	2	2	2	3,45

WT≤2

Cefquinoma

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,13-1	0,13	0,13	0,25	5,88
Anatum	13	0,03-0,25	0,13	0,13	0,25	0,00
Choleraesuis	6	0,03-0,5	0,25	0,5	0,5	33,33
Derby	10	0,13-0,25	0,13	0,13	0,25	0,00
Enteritidis	14	0,06-1	0,13	0,25	1	21,43
Mikawasima	6	0,13-0,25	0,13	0,25	0,25	0,00
Otros	45	0,03-2	0,13	0,25	0,5	11,11
Tomegbe	6	0,03-0,13	0,03	0,13	0,13	0,00
Typhimurium	47	0,03-4	0,25	0,25	0,5	12,77
Subtotal	164	0,03-4	0,13	0,25	0,5	10,37
Brandenburg	6	0,13-2	0,5	0,5	2	83,33
Otros	6	0,13-2	0,13	0,5	2	50,00
Rissen	11	0,13-2	0,5	1	1	90,91
Typhimurium	16	0,13-8	4	4	8	87,50
Subtotal	39	0,13-8	0,5	4	4	82,05
TOTAL	203	0,03-8	0,13	0,25	1	24,14

WT≤0,25

Ácido nalidíxico

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	2-256	2	4	4	5,88
Anatum	13	2-4	2	2	4	0,00
Choleraesuis	6	2-32	4	4	32	16,67
Derby	10	1-4	2	2	2	0,00
Enteritidis	14	2->512	16	128	256	50,00
Mikawasima	6	2-32	2	4	32	16,67
Otros	45	1->512	2	128	256	26,67
Tomegbe	6	0,5-2	1	1	2	0,00
Typhimurium	47	1->512	2	4	256	14,89
Subtotal	164	0,5->512	2	4	128	17,68
Brandenburg	6	8-16	8	16	16	0,00
Otros	6	2-256	2	4	256	16,67
Rissen	11	2-4	2	4	4	0,00
Typhimurium	16	2-256	2	4	32	18,75
Subtotal	39	2-256	4	8	32	10,26
TOTAL	203	0,5->512	2	4	128	16,26

WT≤16

Enrofloxacina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,03-1	≤0,03	≤0,03	≤0,03	5,88
Anatum	13	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Choleraesuis	6	0,03-0,25	0,06	0,06	0,25	16,67
Derby	10	0,03-0,06	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Enteritidis	14	≤0,03-0,5	0,06	0,25	0,25	35,71
Mikawasima	6	0,03-0,06	≤0,03	0,06	0,06	0,00
Otros	45	0,03-0,5	≤0,03	0,06	0,25	17,78
Tomegbe	6	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Typhimurium	47	0,03-1	≤0,03	≤0,03	0,5	14,89
Subtotal	164	0,03-1	≤0,03	≤0,03	0,25	13,41
Brandenburg	6	0,06-0,13	0,13	0,13	0,13	0,00
Otros	6	0,03-0,25	0,06	0,06	0,25	16,67
Rissen	11	0,03-0,06	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Typhimurium	16	0,03-1	≤0,03	0,06	0,13	6,25
Subtotal	39	0,03-1	≤0,03	0,06	0,13	5,13
TOTAL	203	0,03-1	≤0,03	0,06	0,25	11,82

WT≤0,13

Ciprofloxacina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	≤0,03	5,88
Anatum	13	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Choleraesuis	6	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Derby	10	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Enteritidis	14	0,03-0,5	≤0,03	0,13	0,25	42,86
Mikawasima	6	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Otros	45	0,03-0,25	≤0,03	0,13	0,13	28,89
Tomegbe	6	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Typhimurium	47	0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	0,13	12,77
Subtotal	164	0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	0,13	15,85
Brandenburg	6	0,03-0,13	≤0,03	≤0,03	0,13	16,67
Otros	6	0,03-0,25	≤0,03	0,06	0,25	16,67
Rissen	11	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,00
Typhimurium	16	0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	0,13	25,00
Subtotal	39	0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	0,13	15,38
TOTAL	203	0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	0,13	15,76

WT≤0,064

Sulfametoxazol

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,25->512	>512	>512	>512	88,24
Anatum	13	0,25->512	32	32	>512	23,08
Choleraesuis	6	256->512	>512	>512	>512	83,33
Derby	10	0,13->512	>512	>512	>512	60,00
Enteritidis	14	1->512	32	64	>512	14,29
Mikawasima	6	0,13->512	32	32	>512	16,67
Otros	45	0,13->512	32	>512	>512	31,11
Tomegbe	6	16->512	>512	>512	>512	0,00
Typhimurium	47	0,13->512	>512	>512	>512	85,11
Subtotal	164	0,13->512	>512	>512	>512	52,44
Brandenburg	6	256->512	>512	>512	>512	83,33
Otros	6	>512	>512	>512	>512	100,00
Rissen	11	64->512	>512	>512	>512	90,91
Typhimurium	16	64->512	>512	>512	>512	87,50
Subtotal	39	64->512	>512	>512	>512	89,74
TOTAL	203	0,03->512	>512	>512	>512	59,61

WT≤256

Sulfametoxazol-trimetoprim

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	1->512	2	>512	>512	82,35
Anatum	13	0,03->512	1	1	2	15,38
Choleraesuis	6	0,5->512	>512	>512	>512	83,33
Derby	10	1->512	2	8	8	60,00
Enteritidis	14	0,13->512	0,5	2	512	35,71
Mikawasima	6	0,13->512	1	2	>512	33,33
Otros	45	0,13->512	1	2	>512	28,89
Tomegbe	6	1->512	1	2	>512	33,33
Typhimurium	47	0,13->512	>512	>512	>512	85,11
Subtotal	164	0,13->512	2	>512	>512	54,27
Brandenburg	6	>512	>512	>512	>512	100,00
Otros	6	0,13->512	>512	>512	>512	83,33
Rissen	11	4->512	>512	>512	>512	100,00
Typhimurium	16	0,13->512	2	8	>512	56,25
Subtotal	39	0,13->512	>512	>512	>512	79,49
TOTAL	203	0,13->512	2	>512	>512	59,11

WT≤1

Trimetoprim

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	0,13->512	≤0,13	>512	>512	35,29
Anatum	13	0,13->512	≤0,13	0,25	256	15,38
Choleraesuis	6	256->512	>512	>512	>512	100,00
Derby	10	0,13->512	≤0,13	≤0,13	>512	20,00
Enteritidis	14	0,13-128	0,25	2	8	14,29
Mikawasima	6	0,13->512	≤0,13	0,5	>512	16,67
Otros	45	0,13->512	≤0,13	0,5	>512	11,11
Tomegbe	6	≤0,13	≤0,13	≤0,13	≤0,13	0,00
Typhimurium	47	0,13->512	>512	>512	>512	55,32
Subtotal	164	0,13->512	0,25	>512	>512	30,49
Brandenburg	6	>512	>512	>512	>512	100,00
Otros	6	2->512	>512	>512	>512	83,33
Rissen	11	0,13->512	>512	>512	>512	72,73
Typhimurium	16	0,25->512	0,25	0,5	>512	25,00
Subtotal	39	0,13->512	>512	>512	>512	58,97
TOTAL	203	0,13->512	0,25	>512	>512	35,96

WT≤2

Tetraciclina

Serovar	N	Rango	CMI50	CMI75	CMI90	AMR (%)
4,5,12:i:-	17	256-512	256	256	512	100,00
Anatum	13	0,5-16	0,5	2	16	15,38
Choleraesuis	6	32-256	128	256	256	100,00
Derby	10	32-256	64	128	256	100,00
Enteritidis	14	0,5-128	1	8	16	21,43
Mikawasima	6	0,13-64	0,5	16	64	33,33
Otros	45	0,13-256	1	64	64	37,78
Tomegbe	6	0,13-16	0,5	0,5	16	16,67
Typhimurium	47	0,25-512	256	256	256	91,49
Subtotal	164	0,13-512	32	256	256	61,59
Brandenburg	6	64-256	128	128	256	100,00
Otros	6	32-128	64	128	128	100,00
Rissen	11	64-256	128	128	128	100,00
Typhimurium	16	128-512	256	512	512	100,00
Subtotal	39	32-512	128	256	512	100,00
TOTAL	203	0,13-512	64	256	256	68,97

WT≤8

Cuadro de la portada:

Luis Canelo Gutiérrez

Sin título, díptico – 2009

Acrílico sobre madera – 200 x 240 cm.

Reproducido con el permiso del autor.