

Fuertes perfiles de resistencia a antibióticos en *Salmonella* spp. aislada de carne de res molida en el centro de México

Carlos M. Campos-Granados¹

 0000-0002-0079-2621

Luz del Carmen Sierra Gómez Pedroso¹

Cindy F. Hernández-Pérez²

Nayarit Emérita Ballesteros-Nova¹

 0000-0002-3001-6439

María Salud Rubio-Lozano^{1*}

 0000-0002-7975-4547

Luisa María Sánchez-Zamorano³

 0000-0002-4871-3945

Enrique Jesús Delgado-Suárez^{1*}

 0000-0001-5380-8095

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ciudad de México, México

²Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria, Estado de México, México

³Instituto Nacional de Salud Pública, Dirección de Enfermedades Crónicas, Centro de Investigación en Salud Poblacional, Cuernavaca, Morelos, México

***Autores para correspondencia:**

Correo electrónico:
msalud65@gmail.com
ejds@fmvz.unam.mx

Resumen

Se determinó la frecuencia de contaminación con *Salmonella enterica* (SE) en la carne molida de res que se comercializa en ocho capitales estatales del centro de México (n = 115), así como el fenotipo y genotipo de resistencia a antimicrobianos (RAM) de los aislamientos obtenidos. Se detectó SE en 48/115 muestras, con tasas variables de contaminación (10-80 %) por zona geográfica ($\chi^2 = 24.2$, P = 0.0021). Se obtuvieron 116 aislamientos y se observó circulación de serotipos implicados en salmonelosis humana en México (Agona, Anatum, Infantis, Newport, Derby, Give y Typhimurium). La resistencia fue más frecuente en tetraciclina (39.7 %), cloranfenicol (37.9 %), estreptomycin (37.1 %), trimetoprima-sulfametoxazol (31.0 %) y ampicilina (28.4 %), moderada en azitromicina (14.7 %), escasa en cefalosporinas (2.6-3.4 %) y nula en carbapenémicos, mientras que 38.8 % de los aislamientos fue multi-drogo resistente (MDR). Los genomas secuenciados portaban alelos de resistencia contra aminoglucósidos (*aadA*, *aac*, *aph*), beta-lactámicos (*bla-CARB*, *bla-PSE*, *bla-TEM*, *bla-CTX-M*, *bla-CMY*), fenicoles (*floR*), inhibidores de la vía del folato (*sul*, *dfra*), fluoroquinolonas (*qnrAB*, *oqxAB*), tetraciclinas (*tetABM*) y macrólidos: *mph(A)* y *lnu(F)*. Se concluye que la carne bajo estudio es reservorio de SE con preocupantes fenotipos de MDR y que el patógeno ha adquirido genes de RAM contra antibióticos usados en medicina humana y veterinaria. El auge de resistencia contra azitromicina es particularmente alarmante y no se había reportado hasta el momento. Se requieren estudios más amplios para una mejor caracterización de la RAM en las poblaciones de SE asociadas con bovinos.

Palabras clave: *Salmonella* spp.; Carne de res molida; Antibióticos; Fenotipo; Genotipo; Multirresistencia.

Cómo citar este artículo:

Campos-Granados CM, Sierra Gómez Pedroso L del C, Hernández-Pérez CF, Ballesteros-Nova NE, Rubio-Lozano MS, Sánchez-Zamorano LM, Delgado-Suárez EJ. Fuertes perfiles de resistencia a antibióticos en *Salmonella* spp. aislada de carne de res molida en el centro de México. Veterinaria México OA. 2023;10. doi: 10.22201/fmvz.24486760e.2023.1215.

Recibido: 2023-05-09

Aceptado: 2023-06-13

Publicado: 2023-09-05

Información y declaraciones adicionales en la página 16

© Derechos de autor 2023
Carlos M. Campos-Granados et al.

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Contribución del estudio

En esta investigación se documenta el papel de la carne de res molida como un importante reservorio de *Salmonella enterica*, uno de los principales patógenos transmitidos por alimentos a escala global. El estudio demuestra que esta bacteria ha adquirido un amplio repertorio de genes que le permite crecer en presencia de múltiples antibióticos de importancia crítica en medicina humana y que también se emplean en medicina veterinaria. Esto confirma la necesidad de fortalecer el monitoreo de patógenos asociados con alimentos, considerando sus perfiles de resistencia como un factor de riesgo adicional en inocuidad alimentaria y en salud pública.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su informe de 2015 sobre enfermedades transmitidas por alimentos, reportó que cada año ocurren más de 150 millones de casos y cerca de 60 mil muertes por salmonelosis no tifoidea a escala global.⁽¹⁾ En México, la incidencia de esta enfermedad en la última década (> 60 casos/100 mil habitantes)⁽²⁾ es al menos tres veces superior a la de países desarrollados, lo que resalta su importancia epidemiológica en el país.

Se ha establecido que la carne de diferentes especies, entre ellas la de bovino, es un reservorio importante de SE, el agente causal de la salmonelosis. Estudios realizados en México reportan frecuencias de contaminación con este patógeno de moderadas a altas (15 a > 50 %), en carne de res de venta al público en diferentes estados.⁽³⁾

Lo anterior cobra mayor relevancia ante el incremento de la RAM que se observa en cepas de SE, con proporciones crecientes de aislamientos con fenotipos MDR (26-70 %), tanto en México como en otros países.⁽⁴⁻⁷⁾ Estas evidencias sugieren que al menos una parte de las salmonelosis asociadas con el consumo de carne de res podría involucrar cepas MDR. Tal razonamiento es plausible, considerando que esto ocurre en naciones desarrolladas, en las cuales la frecuencia de contaminación de la carne con SE es inferior a la que se ha reportado en México.⁽⁸⁾

A pesar de la importancia de la salmonelosis y particularmente, de la salmonelosis causada por cepas MDR, son escasos los estudios que abordan la resistencia a antibióticos en SE asociada con carne de res. La mayoría de los estudios son de alcance local⁽⁹⁻¹¹⁾ y muy pocos abordan, de manera conjunta, la RAM fenotípica y genotípica,^(4, 12) lo cual puede contribuir a identificar los factores involucrados en la emergencia y la diseminación de la RAM, así como a delinear medidas para su contención.

En este trabajo se realizó un muestreo de alcance regional para determinar la frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp. en la carne molida de res que se expende en las capitales de ocho estados del centro de México. Además, se caracterizaron los perfiles de RAM de los aislamientos obtenidos, mediante la determinación y el análisis conjunto de la resistencia fenotípica y genotípica, lo que permitió identificar las clases de antibióticos que están perdiendo su efectividad contra este patógeno, así como los factores genéticos que sustentan estos fenotipos y su potencial de diseminación en las poblaciones de SE que circulan en carne de res molida.

Materiales y métodos

Declaración de ética

Este trabajo no requirió de la aprobación del Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, dado que no se emplearon animales. No obstante, cuenta con la aprobación del Comité de Ética en la Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública: No. de registro 17CEI00420160708, FWA: 00015605.

Diseño del estudio y toma de muestras

En este trabajo se analizó una submuestra de puntos de venta ($n = 115$) de lo que corresponde a un proyecto de mayor alcance. Este último, presenta un esquema de estudio epidemiológico transversal con análisis multinivel, en el que la unidad de agrupamiento fueron las ciudades capitales de los estados y la unidad de muestreo individual fueron los establecimientos de venta de carne de res al por menor (carnicerías, tianguis, mercados y supermercados) en el cual se obtendrán 400 muestras de carne molida de res provenientes de las ciudades capitales de los estados del país, en el periodo 2021-2023.

El tamaño de muestra global antes referido (400) se determinó mediante la fórmula para estimar una proporción poblacional con especificación de precisión absoluta.⁽¹³⁾ A partir de estudios previos, se estimó una frecuencia de contaminación del 30 %⁽³⁾ y se trabajó con una precisión del 5 %. De esta manera, se obtuvo un tamaño de muestra global de 384 y para compensar posibles pérdidas, este valor se redondeó a 400. La determinación del número de muestras por ciudad se realizó de manera proporcional a la densidad de puntos de venta en cada una de estas. Es decir, a mayor cantidad de puntos de venta, mayor número de muestras a tomar.

En principio, se tenía contemplado usar una estrategia de muestreo aleatorio, dentro de cada ciudad, con base en los establecimientos de venta registrados en el Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas (DNUE)⁽¹⁴⁾ y con ubicación activa en Google Maps (<https://www.google.com/maps>). Sin embargo, muchos establecimientos cerraron actividades producto de la pandemia de COVID-19. Por tanto, fue necesario realizar un muestreo por conveniencia.

El único criterio de inclusión empleado consistió en requerir que el establecimiento estuviera operando en el momento en el que se realizó el muestreo. En caso contrario, la muestra se tomó del establecimiento en operación más cercano. Para las ciudades en donde se determinó un tamaño muestral menor a 10 puntos de venta, se decidió realizar un sobre-muestreo a 10 muestras como mínimo por ciudad, con el fin de aumentar la probabilidad de obtener aislamientos.

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se analizaron 115 muestras (Cuadro 1), correspondientes a las ocho ciudades capitales de los estados del centro del país (Ciudad de México, Cuernavaca, Tlaxcala, Querétaro, Pachuca, Toluca, Chilpancingo y Puebla).

En cada establecimiento comercial, se adquirieron paquetes con aproximadamente 250 g de carne molida de res, los cuales se colocaron en bolsas plásticas estériles, previamente identificadas y se mantuvieron en hieleras con geles refrigerantes (aproximadamente a 4 °C), para su envío al laboratorio. El análisis de las muestras se realizó dentro de las siguientes 24 h, como máximo.

Cuadro 1. Distribución de las 115 muestras por ciudad capital y entidad federativa que participaron en el estudio

| Ciudad | Estado | Comercios al por menor de carnes rojas | Número de muestras |
|------------------|------------------|--|--------------------|
| Ciudad de México | Ciudad de México | 6 420 | 25 |
| Toluca | Estado de México | 9 548 | 20 |
| Pachuca | Hidalgo | 1 514 | 10 |
| Cuernavaca | Morelos | 1 536 | 10 |
| Puebla | Puebla | 4 153 | 20 |
| Querétaro | Querétaro | 997 | 10 |
| Chilpancingo | Guerrero | 2 016 | 10 |
| Tlaxcala | Tlaxcala | 1 097 | 10 |

Fuente: Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas.⁽¹⁴⁾

Detección, aislamiento y confirmación de *Salmonella* spp.

Las muestras se analizaron según la metodología descrita en la norma oficial mexicana NOM-210-SSA-2014.⁽¹⁵⁾ Este análisis comprende las etapas de pre-enriquecimiento no selectivo con agua peptonada, enriquecimiento selectivo en caldos Rappaport-Vassiliadis y tetrionato, así como la siembra en agares selectivos: entérico Hecktoen, xilosa-lisina-desoxicolato y agar sulfito bismuto.

Seguidamente, los aislamientos con morfología sugestiva a *Salmonella* spp. se confirmaron bioquímicamente mediante las pruebas de agar hierro y triple azúcar (TSI), agar hierro y lisina (LIA) y urea. También se realizó confirmación molecular, mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR punto final), amplificando un fragmento del gen *invA* (500 pb), el cual es constitutivo del género.⁽¹⁶⁾ La descripción detallada de los procedimientos empleados está disponible en la plataforma de acceso abierto protocols.io.⁽¹⁷⁾

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos (AST)

El fenotipo de RAM de los aislamientos se determinó mediante la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer.⁽¹⁸⁾ Se utilizó un panel de 12 antibióticos, incluidos en la lista de antimicrobianos de importancia crítica en medicina humana, de la OMS.⁽¹⁹⁾ El panel se conformó con antibióticos de uso intensivo en medicina humana o veterinaria, así como medicamentos empleados para tratar salmonelosis invasiva o infecciones graves causadas por enterobacterias (Cuadro 2).

Los resultados se interpretaron según los criterios (valores de corte clínicos) del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas inglesas).⁽²⁰⁾ Como organismos de control de calidad se utilizaron dos cepas: una de *Escherichia coli* ATCC 8739 (en sustitución de la cepa *E. coli* ATCC 25922, la cual dejó de dar resultados consistentes con los intervalos especificados en el suplemento M100 del CLSI) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los aislamientos que resistieron a tres o más clases de antibióticos se clasificaron como MDR.⁽²¹⁾ La descripción detallada del procedimiento de AST está disponible en la plataforma de acceso abierto protocols.io.⁽²²⁾

Cuadro 2. Panel de antibióticos utilizados en las pruebas de susceptibilidad y criterios empleados para determinar el fenotipo de resistencia de los aislamientos

| Antibióticos | Concentración (µg) | Fenotipo según el diámetro del halo de inhibición (mm) ¹ | |
|---|--------------------|---|-----|
| | | I | R |
| Penicilinas | | | |
| Ampicilina (AMP) | 10 | 14-16 | ≤13 |
| Amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) | 20/10 | 14-17 | ≤13 |
| Cefalosporinas de tercera generación | | | |
| Ceftriaxona (CRO) | 30 | 20-22 | ≤19 |
| Cefalosporinas de cuarta generación | | | |
| Cefepima (FEP) | 30 | 19-24 | ≤18 |
| Carbapenémicos | | | |
| Meropenem (MEM) | 10 | 20-22 | ≤19 |
| Aminoglucósidos | | | |
| Amikacina (AMK) | 30 | 15-16 | ≤14 |
| Estreptomina (STR) | 10 | 13-14 | ≤12 |
| Fluoroquinolonas | | | |
| Ciprofloxacino (CIP) | 5 | 21-30 | ≤20 |
| Macrólidos | | | |
| Azitromicina (AZM) | 15 | - | ≤12 |
| Tetraciclinas | | | |
| Tetraciclina (TET) | 30 | 12-14 | ≤11 |
| Anfenicoles | | | |
| Cloranfenicol (CHL) | 30 | 11-17 | ≤10 |
| Inhibidores de la vía del folato | | | |
| Trimetoprima-sulfametoxazol (SXT) | 1.25/23.75 | 11-15 | ≤10 |

¹Criterios empleados para clasificar los aislamientos como clínicamente resistentes (R) o intermedias (I).⁽²⁰⁾

Secuenciación del genoma completo y predicción de serotipos

El ADN genómico (gADN) se extrajo utilizando el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit, de Qiagen, según las instrucciones del fabricante. El gADN se cuantificó usando un fluorómetro Qubit 3.0. Las bibliotecas de ADN se prepararon a partir de 1 ng de gADN, utilizando el kit Nextera XT v.2 (Illumina) y secuenciando en el sistema Illumina MiSeq (lecturas pareadas de 2 × 250 pb). La predicción de los serotipos se realizó mediante un análisis *in silico* de los genomas ensamblados, con el programa Salmonella In Silico Typing Resource (SISTR) versión 1.1.2.⁽²³⁾

Evaluación de la calidad y depuración de las lecturas crudas

Para evaluar la calidad inicial de las lecturas crudas se utilizó el programa FastQC.⁽²⁴⁾ Seguidamente se realizó el proceso de depuración para eliminar los adaptadores de secuenciación de Illumina, así como las lecturas de pobre calidad, utilizando el programa Trimmomatic.⁽²⁵⁾ Las secuencias depuradas se analizaron de nuevo con FastQC para garantizar que solo se utilizaron lecturas de alta calidad (Q>30) en los análisis bioinformáticos.

Ensamblado de genomas

El ensamble de los genomas se llevó a cabo en el servidor BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center)⁽²⁶⁾ utilizando el algoritmo de ensamblaje de *novo* del programa SPAdes versión 3.13.1.⁽²⁷⁾ Los ensamblajes se evaluaron con el programa QUAST (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies) versión 5.02,⁽²⁸⁾ para asegurar que cumplieran con los requisitos mínimos para ser utilizados en aplicaciones de inocuidad de alimentos, salud pública y epidemiología: no más de 300 contigs, índice de fragmentación (L_{50}) lo más bajo posible, profundidad de secuenciación $\geq 30x$ y valores de porcentaje de guanina + citosina (GC) y longitud del genoma típicos de *Salmonella enterica* ($48 \leq GC \leq 56$ y 4.5-5.1 Mbp, respectivamente).⁽²⁹⁾ Los datos de calidad del ensamble se proporcionan como información suplementaria (Cuadro S1).

Determinación de genotipos de RAM

La identificación del perfil genómico de RAM se llevó a cabo mediante un análisis *in silico* de los genomas ensamblados, con la ayuda del programa AMRFinderPlus versión 3.8,⁽³⁰⁾ configurado para detectar tanto genes como mutaciones asociadas con RAM.

Análisis estadísticos

Se determinó la frecuencia de positividad a *Salmonella* para cada capital estatal de procedencia de las muestras, así como la proporción de aislamientos por serotipo con fenotipos de susceptibilidad, resistencia o resistencia intermedia a cada antibiótico analizado. Además, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado y la razón de momios para determinar si existía asociación entre la frecuencia de contaminación con SE y los fenotipos de resistencia con la ciudad de procedencia de los aislamientos y con el serotipo. Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson para determinar si existía correlación entre fenotipos y genotipos de RAM. Estos análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics 25.

Resultados

La carne de res molida como reservorio de *Salmonella* spp.

Se observó una frecuencia de contaminación global de 41.7 % (48/115) y se obtuvieron 116 aislamientos de *Salmonella* spp. Las tasas de contaminación de la carne fueron de moderadas a altas (30-80 %) en casi todas las ciudades (Figura 1), excepto Tlaxcala y Querétaro (10 %).

Se detectó asociación significativa ($\chi^2 = 24.2$, $P = 0.0021$) entre la proporción de carne contaminada con el patógeno y la ciudad de procedencia de esta. La positividad a *Salmonella* spp. fue mayor en Cuernavaca y en Toluca: razón de momios 25.5, intervalo de confianza al 95 % (IC95) 2.2-299.3, $P = 0.0016$.

Por otra parte, aunque se observó diversidad de serotipos en la muestra estudiada (18 en total), Anatum ($n = 28$), Adelaide ($n = 13$), Newport ($n = 12$) e Infantis ($n = 11$) representaron, en conjunto, el 55 % de las aislamientos obtenidas y fueron también los más ampliamente distribuidos (Figura 2).

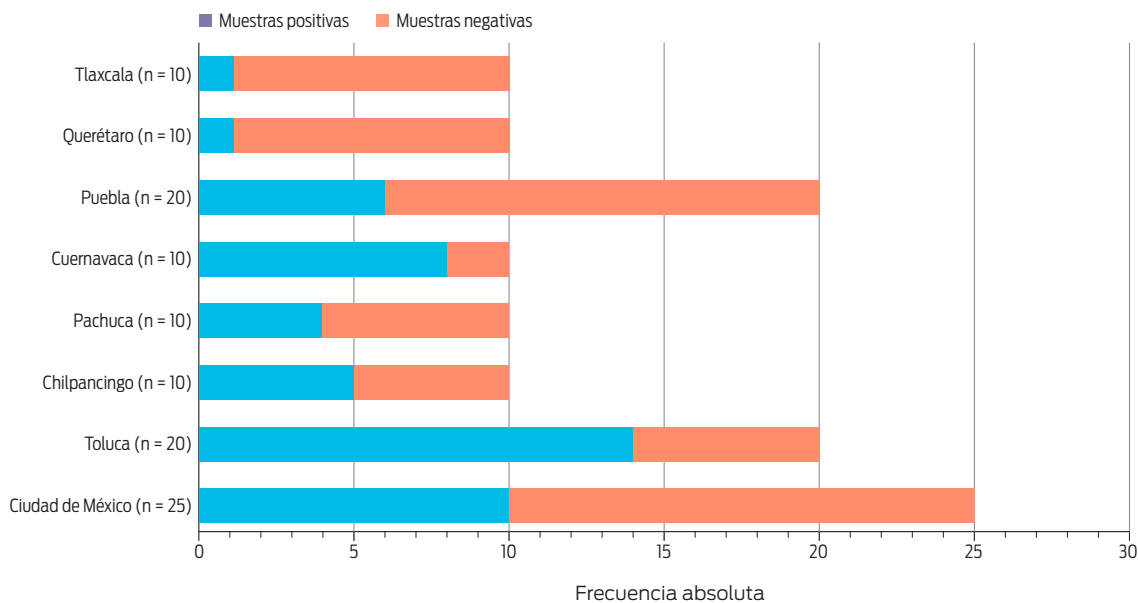


Figura 1. Frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp. en la carne de res molida de venta al por menor en ocho capitales estatales del centro de México (mayo-diciembre 2021).

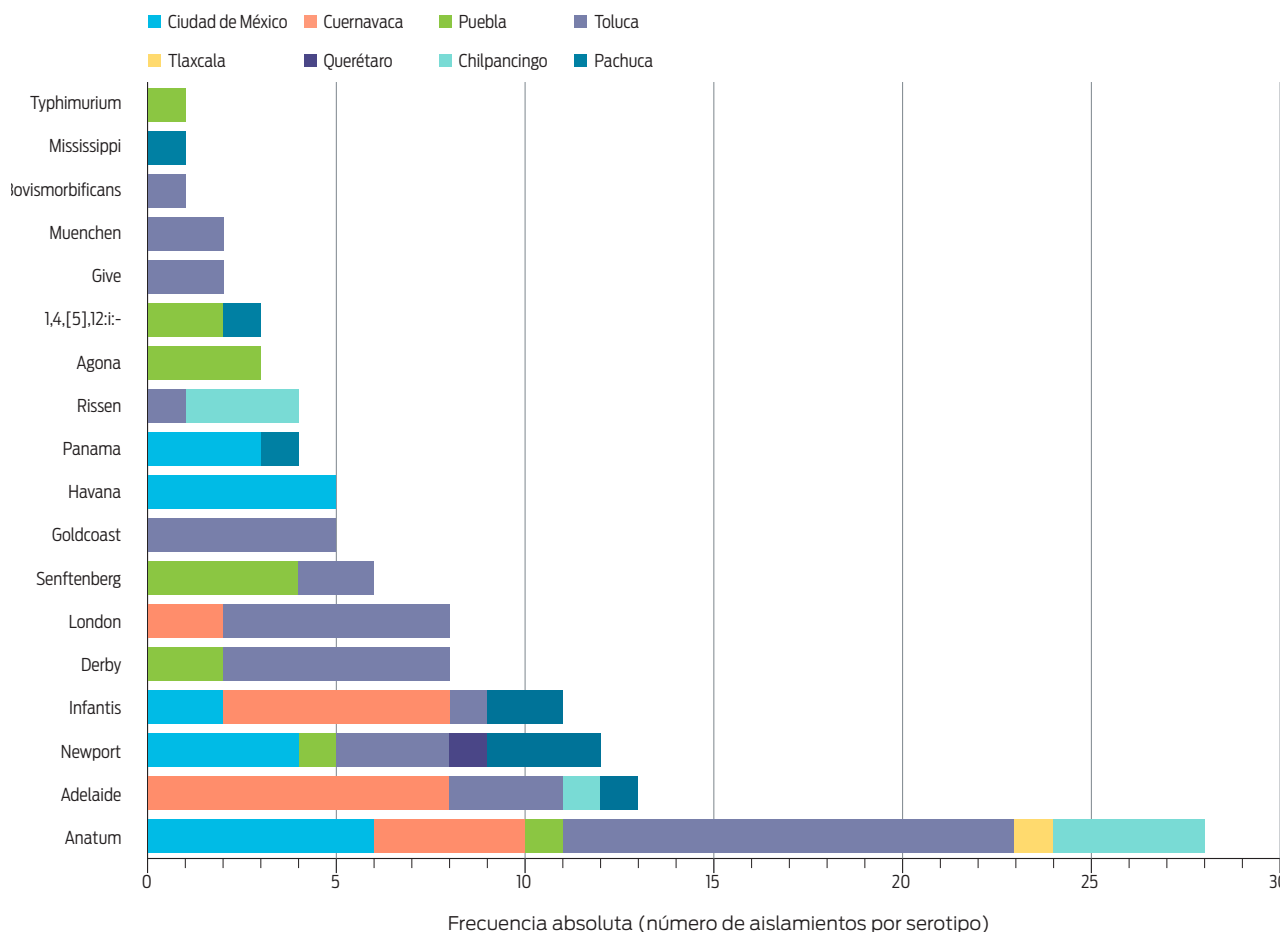


Figura 2. Diversidad y distribución geográfica de serotipos de *Salmonella* spp. identificados en los aislamientos obtenidos (n = 116).

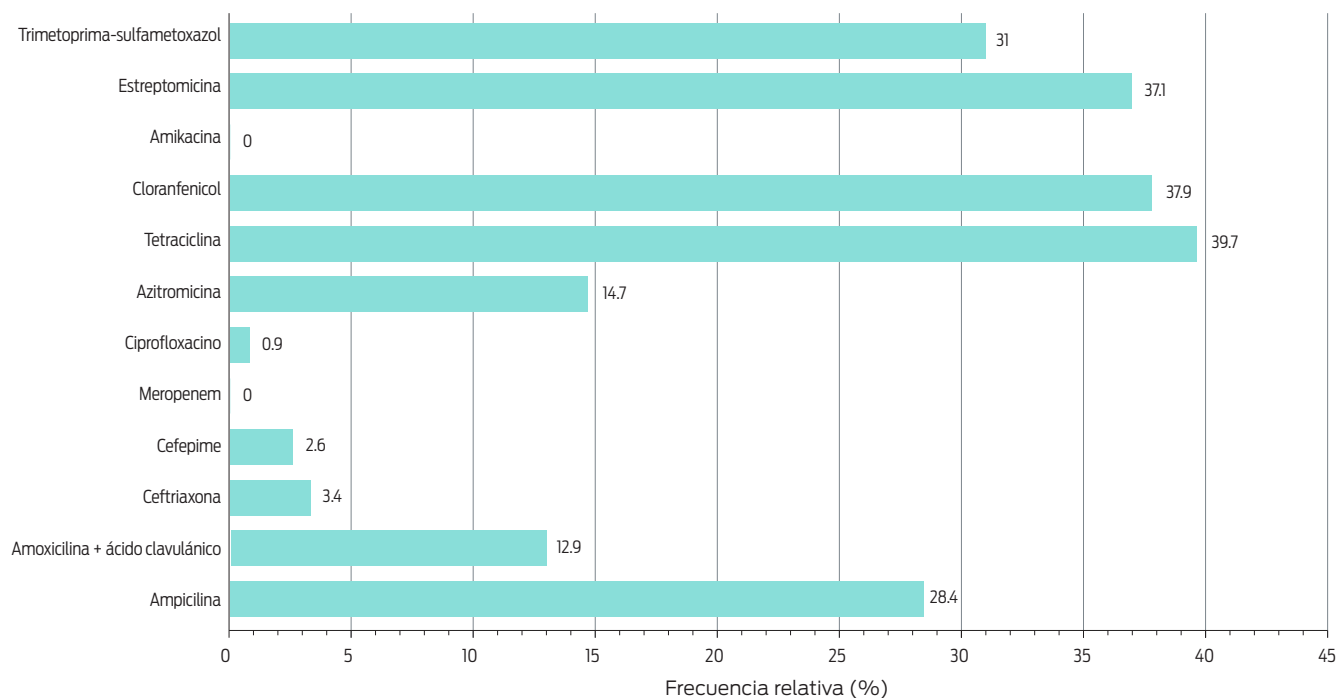


Figura 3. Frecuencia relativa de aislamientos de *Salmonella* spp. resistentes por antibiótico (n = 116).

Fuertes perfiles de resistencia en *Salmonella* spp. asociada con carne de res molida

Se observó resistencia fenotípica contra diez de los 12 antibióticos analizados. Los fenotipos de resistencia más frecuentes involucraron a tetraciclina (39.7 %), cloranfenicol (37.9 %), estreptomicina (37.1 %), trimetoprima-sulfametoxazol (31.0 %) y ampicilina (28.4 %) (Figura 3). Además, cerca del 15 % de los aislamientos mostró resistencia contra azitromicina, una de las alternativas para tratar salmonelosis invasiva.⁽³¹⁾

Afortunadamente, se observó una baja proporción (< 4 %) de aislamientos con resistencia a clases de antibióticos clasificados como de importancia crítica y más alta prioridad por la OMS,⁽¹⁹⁾ tales como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftriaxona y cefepima) y ciprofloxacino. Además, todos los aislamientos presentaron susceptibilidad a meropenem y a amikacina.

La distribución de los fenotipos observados tuvo un comportamiento casi binario, pues el 54.3 % de los aislamientos resultó pan-susceptible y el 38.8 % fue MDR (Figura 4). Asimismo, se encontró asociación significativa entre el serotipo y el perfil de resistencia ($\chi^2 = 38.9$, $P < 0.0001$), con una mayor proporción de fenotipos MDR en aislamientos de los serotipos Newport, Senftenberg, Agona, 1,4,[5],12:i- y Typhimurium que en los demás: razón de momios 69.7, IC95 8.9-547.5, $P < 0.0001$.

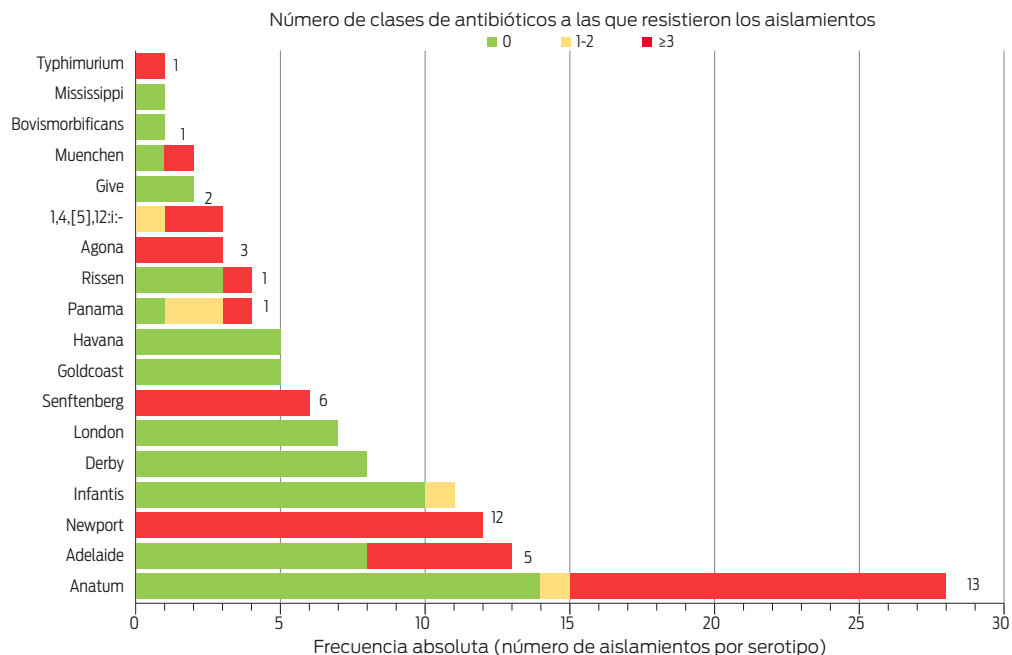


Figura 4. Número de aislamientos, por serotipo, que resultaron pan-susceptibles (0), mono- o bi-resistentes (1-2) o MDR (≥ 3).⁽²¹⁾ Los números adyacentes a las barras de color rojo señalan la frecuencia absoluta de fenotipos MDR.

| Fenotipo ¹ | Serotipo | n | Variantes alélicas de genes de resistencia presentes en los genomas | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------|----|---|------------|------------|-----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|-------------|-------------|------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| | | | <i>aadA</i> | <i>aac</i> | <i>aph</i> | <i>bla-CARB</i> | <i>bla-PSE</i> | <i>bla-TEM</i> | <i>bla-CTX-M</i> | <i>bla-CMY</i> | <i>cmrA</i> | <i>floR</i> | <i>sul</i> | <i>dhfrA</i> | <i>qnrAB</i> | <i>oqxAB</i> | <i>terABM</i> | <i>mph(A)</i> |
| Pan-susceptible | Varios ² | 44 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Varios ³ | 19 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mono o bi-resistencia | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TET | 1,4,[5],12:i:- | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AZM | Infantis | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AMP/AMC | Anatum | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/TET | Derby | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/SXT | Panama | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tri-resistencia | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/TET | 1,4,[5],12:i:- | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CHL/SXT/TET | Anatum | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CHL/SXT/TET | Newport | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tetra-resistencia | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/AMC/CHL/TET | Adelaide | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/SXT | Anatum | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/SXT | Adelaide | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/TET | Panama | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CHL/SXT/TET/AZM | Newport | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/CHL/SXT/TET | Senftenberg | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/CHL/SXT/TET | Anatum | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Penta-resistencia | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/AMC/CHL/SXT/TET | Rissen | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/SXT/TET/AZM | 1,4,[5],12:i:- | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/SXT/TET/AZM | Newport | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/SXT/TET/AZM | Senftenberg | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AMP/AMC/CHL/SXT/TET/AZM | Newport | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/AMC/CRO/FEP/CHL/AZM | Senftenberg | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/AMC/CRO/CHL/TET | Newport | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/SXT/TET | Agona | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/SXT/TET | Anatum | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/CHL/SXT/TET | Muenchen | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/CHL/SXT/TET/AZM | Newport | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sexa- o hepta-resistencia | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/AMC/CHL/SXT/TET/AZM | Newport | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/AMC/CHL/SXT/TET/AZM | Senftenberg | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STR/AMP/AMC/CRO/FEP/CHL/CIP/TET/AZM | Typhimurium | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |

¹STR: estreptomicina, AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, CRO: ceftriaxona, FEP: cefepima, CHL: cloramfenicol, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol, CIP: ciprofloxacino, TET: tetraciclina, AZM: azitromicina.

²Anatum (10), Derby, Goldcoast y Havana (5 cada uno), Adelaide e Infantis (4 cada uno), London y Rissen (3 cada uno), GIVE (2), Bovismorbificans, Muenchen y Panama (1 cada uno).

³Infantis (6), Adelaide, Anatum y London (4 cada uno), Mississippi (1).

Figura 5. Perfil fenotípico y genotípico de resistencia de los aislamientos bajo estudio. Las clases de antibióticos y los genes que codifican resistencia contra estas se identifican mediante código de colores. En los genotipos, las celdas rellenas con el color de la clase indican la presencia del gen, mientras que las celdas en blanco denotan su ausencia.

Determinantes genéticos asociados con los fenotipos de RAM

La resistencia a estreptomycin estuvo fuertemente asociada ($\chi^2 = 87.8$, $P < 0.0001$) con la presencia de variantes alélicas codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, tales como las adenilil-transferasas (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*), acetil-transferasas [*aac(3)-Iva*, *aac(3)-IIId*] y fosfo-transferasas [*aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* y *aph(4)-Ia*] (Figura 5).

En betalactámicos, la resistencia se presentó casi exclusivamente en aislamientos que portaban genes codificantes de betalactamasas de clase A (*bla-CARB*, *bla-TEM*, *bla-CTX-M*, *bla-PSE*) o de clase C (*bla-CMY*) ($\chi^2 = 97.0$, $P < 0.0001$). Como excepción destacable, hubo dos aislamientos del serotipo Senftenberg que resistieron todos los betalactámicos evaluados, excepto los carbapenémicos, sin que se detectaran genes codificantes de betalactamasas en sus genomas. Lo mismo se observó en un aislamiento del serotipo Anatum, la cual mostró resistencia contra las penicilinas (Figura 5).

La resistencia a fenicoles estuvo mediada, principalmente, por el mecanismo de eflujo activo codificado por el gen *floR*, el cual se detectó en el 100 % de los aislamientos que resistieron cloranfenicol (Figura 5). Sólo un aislamiento, del serotipo Typhimurium, portaba en su genoma otro gen de resistencia contra fenicoles (*cmIA1*), aunque este codifica el mismo mecanismo de eflujo activo.

Con respecto a inhibidores de la vía del folato, los fenotipos de resistencia se asociaron ($\chi^2 = 64.7$, $P < 0.0001$) con la presencia de variantes alélicas de los genes que codifican enzimas resistentes a estos antibióticos: dihidropteroato sintetasa (*sul1*, *sul2*) y dihidrofolato reductasa (*dfrA1*, *dfrA12* y *dfrA17*).

Curiosamente, aunque la resistencia a fluoroquinolonas fue muy escasa (solo se observó en un aislamiento del serotipo Typhimurium), más del 40 % de los aislamientos (49/116) manifestó resistencia intermedia contra ciprofloxacino (información suplementaria, Cuadro S2). Este fenotipo se asoció significativamente ($\chi^2 = 53.7$, $P < 0.0001$) con la presencia de genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR, por sus siglas inglesas). Cerca del 90 % de los aislamientos con resistencia intermedia a ciprofloxacino portaban variantes alélicas que codifican proteínas señuelo (*qnrA1*, *qnrB19*), las cuales inhiben la acción de las fluoroquinolonas sobre sus moléculas diana (ADN girasa y topoisomerasa IV) (Figura 5).⁽³²⁾

La resistencia a tetraciclinas estuvo asociada ($\chi^2 = 100.1$, $P < 0.0001$) con la presencia de alelos codificantes de los factores de eflujo activo *tet(A)* y *tet(B)* y de protección ribosomal *tet(M)*,⁽³³⁾ los cuales se detectaron en el 97.8 % de los aislamientos (45/46) con este fenotipo (Figura 5). Y por último, la resistencia a macrólidos se asoció ($\chi^2 = 83.1$, $P < 0.0001$) con la presencia de los alelos codificantes para modificación enzimática *mph(A)* y *lnu(F)* (Figura 5).

Aunque se identificaron mutaciones puntuales en algunos genes asociados con resistencia a diferentes clases de antibióticos (Cuadro 3), estas no se asociaron con los fenotipos de resistencia que se observaron en el estudio ($\chi^2 = 1.1$, $P = 0.58$). Aun así, se observó una fuerte correlación entre fenotipos y genotipos de resistencia ($r = 0.98$, $P < 0.001$, Figura 6).

Otro aspecto a destacar es la diversidad de genes de RAM (ARGd) que se observó en este estudio. La ARGd define el número de genes que codifican diferentes factores de resistencia (familias de proteínas) contra una misma clase de antibióticos, así como el número total de genes de RAM presentes a escala pobla-

Cuadro 3. Mutaciones puntuales en genes asociados con fenotipos de resistencia en los aislamientos de *Salmonella* spp. bajo estudio

| Gen | Mutaciones | Frecuencia relativa (%) | Fenotipo de resistencia asociado |
|-----------------|--|-------------------------|-----------------------------------|
| <i>ramR</i> | M1V, L115I, M83T | 100.0 | Multirresistencia ⁽³⁵⁾ |
| <i>acrB</i> | M964T | 100.0 | Macrólidos ⁽³⁶⁾ |
| <i>gyrA</i> | D795E, T661N | 3.7 | Quinolonas ⁽³⁷⁾ |
| <i>gyrB</i> | T717N, Q624K | 12.8 | Quinolonas ⁽³⁷⁾ |
| <i>parC</i> | T255S, T57S, S469A, H747P, N395S, A620T, E6A, R365L | 100.0 | Quinolonas ⁽³⁷⁾ |
| <i>parE</i> | T599I, P231L | 5.5 | Quinolonas ⁽³⁷⁾ |
| <i>pmrA</i> | T89S, P102L | 22.0 | Colistina ⁽³⁸⁾ |
| <i>pmrB</i> | M15T, A111T, GV73SI, I83V | 21.1 | Colistina ⁽³⁸⁾ |
| <i>16s_rrsD</i> | A1296T, A406G, AAG538TTC, C1074T, C523A, T412C, T409G, A508G, A525T, G536A, G540C, T544C, G1453A | 100.0 | Aminoglucósidos ⁽³⁹⁾ |

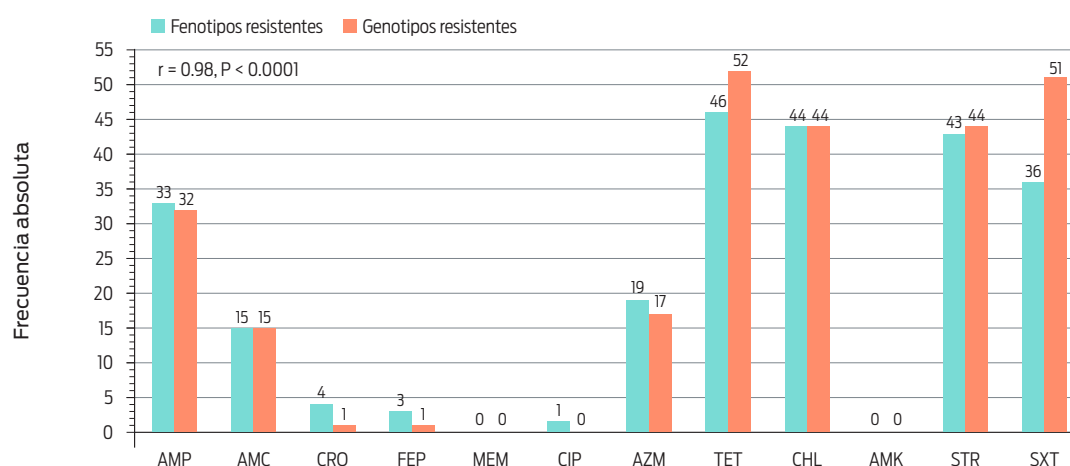


Figura 6. Correlación entre fenotipos y genotipos de RAM en los aislamientos secuenciados (n = 116). STR: estreptomicina, AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, CRO: ceftriaxona, FEP: cefepima, CHL: cloramfenicol, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol, CIP: ciprofloxacino, TET: tetraciclina, AZM: azitromicina.

cional.⁽³⁴⁾ De manera conjunta, los aislamientos portaban 15 genes de RAM contra las siete clases de antibióticos evaluadas, con al menos dos genes codificantes de diferentes factores de resistencia por clase, excepto en aminoglucósidos, con tres (*aac*, *aadA* y *aph*) (Figura 5). Notablemente, entre los aislamientos MDR, casi el 60 % (26/45) presentó tanto fenotipos como genotipos de penta-resistencia o superiores (Figura 5).

Discusión

En este trabajo, se observó una elevada frecuencia global de contaminación con SE (41.7 %) en la carne de res molida que se expende en las capitales de ocho estados del centro de México. No obstante, este fenómeno se presentó de manera poco uniforme, con tasas de contaminación moderadamente bajas en Tlaxcala y Querétaro (10 %) y muy altas en Toluca y Cuernavaca (70 y 80 %, respectivamente).

Estos hallazgos coinciden con lo reportado anteriormente en otras ciudades mexicanas (5-71 %),^(6, 11, 40, 41) variación que se ha relacionado con diferencias en materia de prácticas higiénicas entre las cadenas productivas vinculadas al mercado formal (ej. supermercados) o informal (ej. tianguis y mercados populares).⁽⁴²⁾

Al margen de lo anterior, los resultados confirman que, a diferencia de otras naciones, en las cuales la contaminación de la carne de res molida con SE es baja (ej. 0-5 %),^(43, 44) en México esta constituye un importante reservorio del patógeno. Además, se documentó la circulación de serotipos de SE frecuentemente implicados en salmonelosis humana (ej. Agona, Anatum, Infantis, Newport, Derby, Give y Typhimurium);⁽³⁾ mientras que alrededor de cuatro de cada diez aislamientos presentaron también fuertes perfiles de RAM.

Las evidencias anteriores permiten dimensionar el riesgo de exposición humana a cepas de SE multirresistentes, a través de la carne de res molida, en la zona central del país. Aunque en México la identificación de los alimentos implicados en enfermedades de origen alimentario no se ha sistematizado, en otras naciones, con tasas de contaminación mucho más bajas, la carne de res molida se ha vinculado con brotes de salmonelosis.^(8, 45)

Con respecto a los perfiles de RAM, las clases de antibióticos que resultaron menos efectivas contra SE son las que se han empleado en producción animal por décadas (tetraciclinas, fenicoles, aminoglucósidos y sulfonamidas) y que actualmente están autorizadas para uso en bovinos en México.⁽⁴⁶⁾

Estos resultados son consistentes con los de trabajos previos con SE de origen bovino,^(4, 6, 10, 47-49) en los cuales se reportan tasas de resistencia de hasta 90 % contra las clases de antibióticos antes referidas. Asimismo, evidencian que el patógeno ha adquirido, de forma masiva, genes de RAM contra estos medicamentos, un fenómeno que se ha documentado también en países desarrollados.⁽⁵⁰⁾

Muchos de los genes de RAM antes referidos están vinculados con elementos genéticos móviles, tales como plásmidos⁽³³⁾ y transposones.⁽⁵¹⁾ Ello permite su transferencia horizontal por conjugación, favoreciendo que se propaguen, tanto dentro de las poblaciones de SE, como hacia otros patógenos asociados con la especie bovina, tales como *Bruceella* spp., para el cual existen pocas opciones de tratamiento, entre ellas las tetraciclinas.⁽⁵²⁾

Otro factor importante a considerar es el riesgo de propagación de RAM asociado con el empleo de antibióticos de una misma clase en animales y en humanos. Un ejemplo ilustrativo de ello es el de los fenicoles. En casi todo el mundo, el cloranfenicol está reservado para uso humano desde hace décadas. Sin embargo, el florfenicol cuenta con registro para uso veterinario.⁽⁴⁶⁾ Tanto en este estudio como en investigaciones previas,^(4, 12) la resistencia a cloranfenicol se ha relacionado, predominantemente, con el factor de eflujo activo *floR*, el cual afecta a ambos fenicoles.⁽⁵³⁾

En concordancia con reportes previos, la resistencia a betalactámicos afectó principalmente a las penicilinas,^(4, 6, 54, 55) lo que resalta la importancia de la carne molida de res como reservorio de SE resistente a penicilinas y como factor que puede contribuir a la diseminación de genes de RAM contra esta clase de antibióticos.

Afortunadamente, la resistencia a cefalosporinas de tercera (3GC) o cuarta generación (4GC) y a carbapenémicos fue escasa o nula. Tales hallazgos son consistentes con el predominio de genes codificantes de betalactamasas de clase A

(*bla-CARB*, *bla-CTX-M*, *bla-PSE* y *bla-TEM*), las cuales hidrolizan penicilinas,⁽⁵⁶⁾ en los aislamientos bajo estudio. En contraste, sólo dos aislamientos (uno de Typhimurium y uno de Newport) portaban el gen codificante de la betalactamasa de clase C *bla-CMY*, la cual tiene actividad tanto contra penicilinas como contra cefalosporinas.⁽⁵⁶⁾

Los carbapenémicos, 3GC y 4GC son considerados por la OMS como antibióticos de importancia crítica y máxima prioridad, por ser de las pocas alternativas que quedan para tratar infecciones graves causadas por bacterias gramnegativas.⁽¹⁹⁾ Afortunadamente, tanto los resultados de este trabajo como los de estudios mexicanos previos,^(3,4,12) sugieren que los bovinos de carne, al menos hasta el momento, no es un reservorio importante de SE resistente a estas clases de antibióticos.

A pesar de lo anterior, la progresiva pérdida de efectividad de los antibióticos más usados en producción animal, está conllevando al uso de otros más potentes, tales como 3GC (ej. ceftriaxona)⁽⁴⁶⁾ de importancia crítica en medicina humana.⁽¹⁹⁾ Dado que hasta el momento la resistencia a 3GC en SE de origen alimentario en México es limitada, conviene revisar la pertinencia de mantener el registro de 3GC para fines veterinarios. En Canadá y en Estados Unidos de América, se ha comprobado que la restricción en el uso de 3GC de uso veterinario (ceftiofur) y humano (ceftriaxona), en animales, ha contribuido a reducir la resistencia a esta vital clase de antibióticos en SE asociada con especies productivas.⁽⁵⁰⁾

Con respecto a fluoroquinolonas, no se observó asociación entre las mutaciones detectadas y los fenotipos, a pesar de que estas se consideran el mecanismo más importante de resistencia contra estos antibióticos en enterobacterias.⁽⁵⁷⁾ Al parecer, esto se debió a que las mutaciones que portaban nuestros aislamientos se encontraban fuera de la zona determinante de resistencia a quinolonas.⁽⁵⁸⁾ En línea con estudios previos,^(4,12) nuestros resultados confirman que la presencia de genes PMQR (alelos de *qnrA* y *qnrB*) es una característica cada vez más común en aislamientos de SE de origen bovino en México. Su amplia diseminación es consistente con su origen plasmídico, así como con la disminución de la susceptibilidad a ciprofloxacino en aislamientos que portan estos genes, lo cual se manifiesta en elevadas tasas de resistencia intermedia (40-50 %).^(10,12)

En conjunto, la evidencia experimental acumulada hasta la fecha documenta una abundancia creciente de genes PMQR en SE de muestras bovinas. Ello sugiere que estos genes podrían estar sujetos a presión selectiva en el contexto productivo, lo cual es congruente con el registro de enrofloxacin y ciprofloxacino para el tratamiento de infecciones en esta especie en México.⁽⁴⁶⁾ Hasta el momento, se carece de evidencias para determinar si los genes PMQR podrían conferir resistencia a fluoroquinolonas en el contexto clínico. No obstante, la creciente diseminación de estos genes en las poblaciones de SE de origen alimentario, así como la asociación que se ha observado entre la emergencia de fenotipos resistentes a fluoroquinolonas y la presencia de genes PMQR,^(59, 60) resalta la importancia de profundizar la investigación en este campo.

En concordancia con investigaciones recientes,⁽¹²⁾ en este trabajo se observó que el 100% de los aislamientos portaba una mutación en el gen *acrB*. Aunque este fenómeno se ha asociado con resistencia a macrólidos en cepas tifoideas de SE,⁽³⁶⁾ la mutación que aquí se detectó (M964T) no se asoció con resistencia a azitromicina. Además, hasta donde pudimos investigar, tampoco se ha reportado como un mecanismo relevante de resistencia contra macrólidos.

Llama la atención, no obstante, que cerca del 15 % de los aislamientos resistieron azitromicina y portaban genes codificantes de mecanismos de modificación enzimática de macrólidos: *mph(A)* y *lnu(F)*. En este caso, no se observa relación con el uso de este antibiótico en animales, pues no está registrado para este fin en México.⁽⁴⁶⁾ Los estudios mexicanos realizados en la última década (2000-2017),⁽³⁾ no reportan resistencia a azitromicina en SE de origen alimentario. De igual forma, trabajos recientes de nuestro grupo de investigación documentan una baja frecuencia de genes de RAM contra macrólidos en SE de origen bovino y aviar en México.^(4,12) Por tanto, es necesario ampliar la investigación en este campo, para determinar si la emergente resistencia contra macrólidos que aquí se observó es un fenómeno regional o si se deriva del uso intensivo de otros macrólidos (ej. tilosina) con registro para uso veterinario.⁽⁴⁶⁾

Los aislamientos de este estudio portaban también genes de RAM contra antibióticos que no fueron incluidos en las pruebas de susceptibilidad. Tal es el caso de la fosfomicina, la cual también es considerada de importancia crítica y se usa con frecuencia para tratar infecciones del tracto urinario en humanos.⁽⁶¹⁾ Sin embargo, también está aprobado para su uso en bovinos y porcinos en México,⁽⁴⁶⁾ lo que podría explicar la presencia de estos genes en cerca del 15% de nuestros aislamientos (información suplementaria, Cuadro S2).

Por otra parte, aunque solo un aislamiento portaba el gen *mcr1.1*, el cual confiere resistencia a colistina,⁽⁶²⁾ el hallazgo no es menor, pues las polimixinas son antibióticos de último recurso para tratar infecciones graves, causadas por bacterias gramnegativas.⁽¹⁹⁾ Además, este gen es portado en plásmidos⁽⁶²⁾ y por consiguiente, existe riesgo de que se propague con facilidad entre las poblaciones bacterianas asociadas con el ganado.

Otro hallazgo destacable es la amplia distribución de genes de resistencia contra desinfectantes de amonio cuaternario (*qacL*, *qacE* y *qacEdelta-1*) que se observó en los aislamientos. Estos genes codifican factores de eflujo activo⁽⁶³⁾ y tanto en este trabajo (información suplementaria, Cuadro S2) como en investigaciones previas,⁽⁴⁾ se asocian con fenotipos MDR, ya que usualmente son reclutados en integrones junto con otros genes de RAM.⁽⁶⁴⁾ Está por determinar, no obstante, si el uso intensivo de compuestos de amonio cuaternario en las cadenas alimentarias favorece la adquisición y conservación de integrones con múltiples casetes de resistencia.

Una proporción moderadamente alta (~40 %) de los aislamientos presentó preocupantes fenotipos de MDR, afectando clases de antibióticos consideradas por la OMS de importancia crítica y máxima prioridad (macrólidos), de importancia crítica (aminoglucósidos y penicilinas) y de gran importancia (tetraciclinas, fenicoles, sulfonamidas).⁽¹⁹⁾ La asociación que aquí se observó entre la frecuencia de fenotipos MDR y serotipos de relevancia en salud pública confirma que la adquisición de genes de RAM es un distintivo de cepas de SE epidemiológicamente relevantes.⁽⁶⁵⁾ A su vez, enfatiza la necesidad de mantener la vigilancia de la RAM en SE de origen alimentario.

Nuestros resultados sugieren que podría existir presión selectiva sobre algunos genes de RAM en SE asociada con producción animal. En este sentido, observamos que los aislamientos de este estudio portaban entre dos y tres genes codificantes de diferentes factores de RAM para una misma clase de antibióticos. Además, aunque algunos aislamientos no portaban genes de RAM conocidos, presentaron

fenotipos resistentes. Ello evidencia convergencia evolutiva de las cepas de SE, al acumular diversos mecanismos de RAM contra un mismo antibiótico, a escala poblacional, como respuesta aparente a la presión selectiva que enfrentan en este nicho ecológico. No obstante, se requieren estudios específicos que aborden la dinámica evolutiva de la RAM en las poblaciones de SE asociadas con bovinos, un área que rebasa los alcances de este trabajo.

En resumen, este estudio demuestra que la carne de res molida que se expende en las capitales estatales de la región central de México funciona como reservorio de SE y particularmente, de cepas epidemiológicamente relevantes y con fuertes perfiles de multirresistencia.

Los resultados sugieren que las poblaciones de SE están adquiriendo, de forma masiva, genes de RAM contra clases de antibióticos que se usan por igual en medicina humana y veterinaria. Adicionalmente, el amplio repertorio de genes de RAM contra las clases de antibióticos evaluadas sugiere que el patógeno está expuesto a estos medicamentos en el contexto productivo. De particular importancia es el aparente auge de resistencia contra azitromicina, uno de los antibióticos de elección para tratar salmonelosis invasiva. Hasta la fecha, este fenotipo se consideraba infrecuente en cepas de SE de origen alimentario en México.⁽³⁾

El análisis anterior devela la necesidad de revisar la autorización de algunos antibióticos para uso en especies pecuarias. Además, es importante determinar si existe resistencia cruzada entre diferentes antibióticos de una misma clase, aunque estos se usen de manera exclusiva en animales o en humanos.

Por último, es necesario señalar que, aunque se trabajó con un número aceptable de aislamientos, el muestreo que aquí se reporta es de alcance limitado. Por tanto, se requieren estudios más amplios, para obtener estimaciones más precisas y caracterizar de forma más completa la RAM en las poblaciones de SE que circulan en este nicho ecológico.

Disponibilidad de datos

Todos los datos relevantes se encuentran en el manuscrito o en su información suplementaria. Las lecturas crudas de los genomas secuenciados son de acceso público en la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología en Información (NCBI) de Estados Unidos de América (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) y los números de acceso para su descarga se proporcionan como información suplementaria (Cuadro S1).

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración del personal y de estudiantes de licenciatura y posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, así como del personal del Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria y del Instituto Nacional de Salud Pública.

Declaración de financiamiento

Este trabajo se realizó con recursos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, convocatoria "Ciencia de Frontera 2019", proyecto CY087198, a favor de LM Sánchez-Zamorano y EJ Delgado-Suárez. El organismo financiador no participó en el diseño del estudio, la recolección y el análisis de datos, la decisión de publicar, ni en la preparación del manuscrito.

Conflicto de interés

Dos de los autores, María Salud Rubio-Lozano y Enrique Jesús Delgado-Suárez, son miembros del comité editorial de Veterinaria México OA. En cumplimiento de las políticas vigentes de la revista, ambos participaron solo como autores durante el proceso editorial de este envío. Además, todos los autores aceptaron publicar el proceso de revisión por pares junto con el artículo.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: LM Sánchez-Zamorano, EJ Delgado-Suárez, MS Rubio-Lozano
Curación de los datos: CM Campos-Granados, EJ Delgado-Suárez
Análisis formal: CM Campos-Granados, NE Ballesteros-Nova, EJ Delgado-Suárez, CF Hernández-Pérez
Adquisición de fondos: LM Sánchez-Zamorano
Investigación: CM Campos-Granados, EJ Delgado-Suárez, LM Sánchez-Zamorano, MS Rubio-Lozano
Metodología: LM Sánchez-Zamorano, CF Hernández-Pérez, LC Sierra Gómez Pedroso, EJ Delgado-Suárez, MS Rubio-Lozano
Administración del proyecto: LM Sánchez-Zamorano, EJ Delgado-Suárez, MS Rubio-Lozano
Recursos: LM Sánchez-Zamorano, CF Hernández-Pérez, EJ Delgado-Suárez, MS Rubio-Lozano
Supervisión: LM Sánchez-Zamorano, EJ Delgado-Suárez, MS Rubio-Lozano
Validación: LM Sánchez-Zamorano, EJ Delgado-Suárez, MS Rubio-Lozano
Visualización: CM Campos-Granados, EJ Delgado-Suárez, MS Rubio-Lozano, LM Sánchez-Zamorano

Escritura-borrador original: CM Campos-Granados, EJ Delgado-Suárez

Redacción-revisión y edición: CM Campos-Granados, LC Sierra Gómez Pedroso, NE Ballesteros-Nova, CF Hernández-Pérez, EJ Delgado-Suárez, MS Rubio-Lozano, LM Sánchez-Zamorano

Referencias

1. World Health Organization. WHO estimates of the global burden of food-borne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015 (PDF). 2015. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf
2. Secretaría de Salud. Anuarios de morbilidad (PDF). 2021. https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2021/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_fuente_notificacion.pdf
3. Godínez-Oviedo A, Tamplin ML, Bowman JP, Hernández-Iturriaga M. *Salmonella enterica* in Mexico 2000-2017: epidemiology, antimicrobial resistance, and prevalence in food. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2020;17(2):98-118. doi: 10.1089/fpd.2019.2627.
4. Delgado-Suárez EJ, Ortíz-López R, Gebreyes WA, Allard MW, Barona-Gomez F, Rubio-Lozano MS. Genomic surveillance links livestock production with the emergence and spread of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* in Mexico. *Journal of Microbiology*. 2019;57(4). doi: 10.1007/s12275-019-8421-3.
5. Ma Y, Li M, Xu X, Fu Y, Xiong Z, Zhang L, et al. High-levels of resistance to quinolone and cephalosporin antibiotics in MDR-ACSSuT *Salmonella enterica* serovar Enteritidis mainly isolated from patients and foods in Shanghai, China. *International Journal of Food Microbiology*. 2018;286:190-196. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.022.
6. Ballesteros-Nova N, Rubio-Lozano MS, Delgado-Suárez EJ, Méndez-Medina RD, Braña-Varela D, Rodas Suárez O. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud Pública de México*. 2016;58(3):1-7. doi: 10.21149/spm.v58i3.7897.
7. Almeida F, Seribelli AA, Medeiros MIC, Rodrigues DDP, de Mello Varani A, Luo Y, et al. Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. *PLoS One*. 2018;13(8):e0201882. doi: 10.1371/journal.pone.0201882.
8. Laufer AS, Grass J, Holt K, Whichard JM, Griffin PM, Gould LH. Outbreaks of *Salmonella* infections attributed to beef –United States, 1973-2011. *Epidemiology and Infection*. 2015;143(9):2003-2013. doi: 10.1017/S0950268814003112.
9. De la Garza-García JA, Rubio Lozano MS, Wachter-Rodarte MDC, Navarro Ocaña A, Hernández-Castro R, Xicohtencatl-Cortes J, et al. Frecuencia de contaminación y de serotipos de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* en una operación integrada de matanza y deshuese de bovinos. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2020;11(4):971-990. doi: 10.22319/rmcp.v11i4.5111.
10. Realpe-Quintero M, Barba-Leon J, Pérez-Montano JA, Pacheco-Gallardo C, González-Aguilar D, Domínguez-Arias RM, et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes recovered throughout the beef production chain and from patients with salmonellosis. *PeerJ*. 2018;6:e5482. doi: 10.7717/peerj.5482.

11. Cabrera-Diaz E, Barbosa-Cardenas CM, Perez-Montano JA, Gonzalez-Aguilar D, Pacheco-Gallardo C, Barba J. Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico. *Journal of Food Protection*. 2013;76(12):2004-2010. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-109.
12. Delgado-Suarez EJ, Palos-Guiterrez T, Ruiz-Lopez FA, Hernandez Perez CF, Ballesteros-Nova NE, Soberanis-Ramos O, et al. Genomic surveillance of antimicrobial resistance shows cattle and poultry are a moderate source of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* in Mexico. *PLoS One*. 2021;16(5):e0243681. doi: 10.1371/journal.pone.0243681.
13. Aguilar-Barojas S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*. 2005;11(1-2):333-338.
14. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas. 2018. <https://www.inegi.org.mx/app/descarga/?ti=6>
15. NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5398468
16. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*. 1992;6:271-279. doi: 10.1016/0890-8508(92)90002-F.
17. Delgado Suárez EJ. *Salmonella* spp. detection and isolation. *Protocols.io repository*. 2021. doi: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bpybmpsn>.
18. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966;45(4):493-496.
19. World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th Revision (PDF). Antimicrobial Resistance Division, Global Coordination and Partnership, Nutrition and Food Safety; 2019. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-ED31:2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st edition. 2021. <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED31:2021&xormat=SPDF&src=BB>
21. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(3):268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
22. Delgado Suárez EJ. *Salmonella* spp. antibiotic susceptibility testing by the Kirby-Bauer disk diffusion method. *Protocols.io repository*. 2021. doi: 10.17504/protocols.io.bpybmpvn.
23. Yoshida CE, Kruczkiewicz P, Laing CR, Lingohr EJ, Gannon VP, Nash JH, et al. The *Salmonella* In Silico Typing Resource (SISTR): an open web-accessible tool for rapidly typing and subtyping draft *Salmonella* genome assemblies. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147101. doi: 10.1371/journal.pone.0147101.

24. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
25. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
26. Wattam AR, Abraham D, Dalay O, Disz TL, Driscoll T, Gabbard JL, et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(D1):D581-D591. doi: 10.1093/nar/gkt1099.
27. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;19(5):455-477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
28. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086.
29. Deneke C, Brendebach H, Uelze L, Borowiak M, Malorny B, Tausch SH. Species-specific quality control, assembly and contamination detection in microbial isolate sequences with AQUAMIS. *Genes (Basel)*. 2021;12(5). doi: 10.3390/genes12050644.
30. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(11):e00483-19. doi: 10.1128/AAC.00483-19.
31. Tack B, Phoba MF, Thong P, Lompo P, Hupko C, Desmet S, et al. Epidemiological cut-off value and antibiotic susceptibility test methods for azithromycin in a collection of multi-country invasive non-typhoidal *Salmonella*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;28(12):1615-1623. doi: 10.1016/j.cmi.2022.06.009.
32. Lee S, Park N, Yun S, Hur E, Song J, Lee H, et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in non-typhoidal *Salmonella* strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones isolated from human salmonellosis in Gyeonggi-do, South Korea from 2016 to 2019. *Gut Pathogens*. 2021;13(1):35. doi: 10.1186/s13099-021-00431-7.
33. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Donhofer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*. 2014;395(5):559-575. doi: 10.1515/hsz-2013-0292.
34. Escudeiro P, Pothier J, Dionisio F, Nogueira T. Antibiotic resistance gene diversity and virulence gene diversity are correlated in human gut and environmental microbiomes. *mSphere*. 2019;4(3):e00135-19. doi: 10.1128/mSphere.00135-19.
35. Abouzeed YM, Baucheron S, Cloeckaert A. *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(7):2428-2434. doi: 10.1128/AAC.00084-08.
36. Hooda Y, Sajib MSI, Rahman H, Luby SP, Bondy-Denomy J, Santosham M, et al. Molecular mechanism of azithromycin resistance among typhoidal *Salmonella* strains in Bangladesh identified through passive pediatric surveillance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(11):e0007868. doi: 10.1371/journal.pntd.0007868.

37. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1354(1):12-31. doi: 10.1111/nyas.12830.
38. Quesada A, Porrero MC, Tellez S, Palomo G, Garcia M, Dominguez L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(1):71-74. doi: 10.1093/jac/dku320.
39. Nuncio ASP, Webber B, Pottker ES, Cardoso B, Esposito F, Fontana H, et al. Genomic characterization of multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg E2 strain isolated from chicken carcass in southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 2022;379:109863. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109863.
40. Martínez-Chavez L, Cabrera-Díaz E, Pérez-Montano JA, Garay-Martínez LE, Varela-Hernández JJ, Castillo A, et al. Quantitative distribution of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on beef carcasses and raw beef at retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;210:149-155. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.016.
41. Palós Gutiérrez T, Rubio Lozano MS, Delgado Suárez EJ, Rosi Guzmán N, Soberanis Ramos O, Hernández Pérez CF, et al. Lymph nodes and ground beef as public health importance reservoirs of *Salmonella* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2020;11(3):795-810. doi: 10.22319/rmcp.v11i3.5516.
42. Pond A, Miller M, Echeverry A, Huerta-Leidenz N, Rubio-Lozano MS, Chávez A, et al. *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 prevalence and generic *E. coli* and coliform quantitative baseline in raw pork and beef in retail channels in Mexico. *Food Protection Trends*. 2016;67(9):2069-2089.
43. Aslam M, Checkley S, Avery B, Chalmers G, Bohaychuk V, Gensler G, et al. Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Food Microbiology*. 2012;32(1):110-117. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.017.
44. Yin M, Yang B, Wu Y, Wang L, Wu H, Zhang T, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* serovar in retail meats in market place in Uighur, Xinjiang, China. *Food Control*. 2016;64:165-172. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.12.029.
45. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Salmonella* infections linked to ground beef (HTML). 2018. <https://www.cdc.gov/salmonella/newport-10-18/index.html>
46. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Productos químico-farmacéuticos vigentes (CSV). Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Gobierno de México; 2022. <https://datos.gob.mx/busca/dataset/productos-quimicos-farmaceuticos-vigentes>
47. Zaidi MB, McDermott P, Fedorka-Cray P, Leon V, Canche C, Hubert S, et al. Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42:21-28. doi: 10.1086/498508.
48. Miranda JM, Mondragón AC, Martínez B, Guarddon M, Rodríguez JA. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *Journal of Food Protection*. 2009;72(5):966-971. doi: 10.4315/0362-028X-72.5.966.
49. Pérez-Montaña JA, González-Aguilar D, Barba J, Pacheco-Gallardo C, Campos-Bravo CA, García S, et al. Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella*

- serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco state, Mexico. *Journal of Food Protection*. 2012;75(5):867-873. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-423.
50. McDermott PF, Zhao S, Tate H. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiology Spectrum*. 2018;6(4):ARBA-0014-2017. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017.
 51. Akhtar M, Hirt H, Zurek L. Horizontal transfer of the tetracycline resistance gene *tetM* mediated by pCF10 among *Enterococcus faecalis* in the house fly (*Musca domestica* L.) alimentary canal. *Microbial Ecology*. 2009;58(3):509-518. doi: 10.1007/s00248-009-9533-9.
 52. Yousefi-Nooraie R, Mortaz-Hejri S, Mehrani M, Sadeghipour P. Antibiotics for treating human brucellosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;10:CD007179. doi: 10.1002/14651858.CD007179.pub2.
 53. Kim S, Kim SH, Chun SG, Park MS, Lim HM, Lee BK. An additional novel antimicrobial resistance gene cluster in *Salmonella* Genomic Island 1 of a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 human isolate. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009;6(4):471-479. doi: 10.1089/fpd.2008.0199.
 54. Aguilar-Montes de Oca S, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Barba-Leon J, Vazquez-Navarrete J, Acosta-Dibarrat J, et al. Phenotypic and genotypic profile of clinical and animal multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from Mexico. *Journal of Applied Microbiology*. 2018;124(1):67-74. doi: 10.1111/jam.13615.
 55. Villalpando-Guzman S, Vázquez-Quiñones CR, Natividad-Bonifacio I, Curiel-Quesada E, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. Frecuencia, susceptibilidad antimicrobiana y patrón de adherencia de *Salmonella enterica* aislada de carne de pollo, res y cerdo de la Ciudad de México. *Revista Chilena de Infectología*. 2017;34(5):458-466. doi: 10.4067/S0716-10182017000500458.
 56. Mora-Ochomogo M, Lohans CT. β -lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: from covalent inhibitors to substrates. *RSC Medicinal Chemistry*. 2021;12(10):1623-1639. doi: 10.1039/d1md00200g.
 57. Qiu H, Gong J, Butaye P, Lu G, Huang K, Zhu G, et al. CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification confirms the cause-effect relationship between *gyrA* mutation and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 2018;365(13). doi: 10.1093/femsle/fny127.
 58. Thong KL, Ngoi ST, Chai LC, Teh CS. Quinolone resistance mechanisms among *Salmonella enterica* in Malaysia. *Microbial Drug Resistance*. 2016;22(4):259-272. doi: 10.1089/mdr.2015.0158.
 59. Pribul BR, Festivo ML, Rodrigues MS, Costa RG, Rodrigues EC, de Souza MM, et al. Characteristics of quinolone resistance in *Salmonella* spp. isolates from the food chain in Brazil. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:299. doi: 10.3389/fmicb.2017.00299.
 60. Karp BE, Campbell D, Chen JC, Folster JP, Friedman CR. Plasmid-mediated quinolone resistance in human non-typhoidal *Salmonella* infections: an emerging public health problem in the United States. *Zoonoses and Public Health*. 2018;65(7):838-849. doi: 10.1111/zph.12507.
 61. Beharry Z, Palzkill T. Functional analysis of active site residues of the fosfomicin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(18):17786-17791. doi: 10.1074/jbc.M501052200.

62. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(2):161-168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
63. Castro VS, Mutz YDS, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. Inactivation of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* and wild-type *Escherichia coli* STEC using organic acids: a potential alternative to the food industry. *Pathogens*. 2020;9(10). doi: 10.3390/pathogens9100849.
64. Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(9):2069-2089. doi: 10.1093/jac/dks196.
65. Leekitcharoenphon P, Hendriksen RS, Le Hello S, Weill FX, Baggesen DL, Jun SR, et al. Global genomic epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016;82(8):2516-2526. doi: 10.1128/AEM.03821-15.