

Resistencia antibiótica de genotipos de cepas de *Salmonella* spp de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México

Antibiotic resistance of *Salmonella* spp strain genotypes isolated from pigs slaughtered at abattoirs in the Estado de Mexico

Martín Talavera Rojas* Jorge Antonio Varela Guerrero* Nydia Edith Reyes Rodríguez*
Salvador Lagunas Bernabé* Benjamín Valladares Carranza* María Uxua Alonso Fresan*
Valente Velázquez Ordoñez*

Abstract

Multiresistant *Salmonella* serovar Typhimurium strains are a worldwide problem in animal and human health. The aim of this study was to determine the frequency of some *Salmonella* spp resistance genes (*cmlA/tetR*, *PSE-1*, *TEM*, *Sip B/C*) in strains isolated from pigs slaughtered at abattoirs in the Estado de Mexico. Of 87 analyzed strains 22 (25.28%) had phenotypical resistance to chloramphenicol (30 µg), 15 (17.24%) to ampicillin (10 µg) and 54 (62.07%) to sulfamethoxazole (60 µg). The phenotypical and genotypical relation of the 87 strains was: of the 22 chloramphenicol resistant strains only 14 (63.63%) expressed the *cmlA/tetR* resistance gene, and of the 65 strains non-resistant to chloramphenicol only 36 (55.38%) expressed the *cmlA/tetR* resistance gene. Regarding the 15 ampicillin resistant strains only 2 (13.33%) were carriers of the *PSE-1* gene and 7 (46.66%) presented the *TEM* gene; both genes confer genotypical ampicillin resistance. Of 72 non-resistant ampicillin strains, 11 (15.27%) carried the *TEM* gene which confers ampicillin resistance. Two *Salmonella* strains (2.28%) belonged to phagotype DT104. Strains not showing phenotypical resistance but carrying resistance genes have not been exposed to selection by competition, although they possess the mechanism to express such resistance.

Key words: *SALMONELLA* TYPHIMURIUM, RESISTANCE, PIGS, ANTIBIOTICS.

Resumen

La aparición de cepas multirresistentes de *Salmonella* Typhimurium es un problema mundial, tanto en salud animal como en salud pública. El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de algunos genes de resistencia (*cmlA/tetR*, *PSE-1*, *TEM*, *Sip B/C*) en cepas de *Salmonella* spp aisladas de cerdos en rastros del Estado de México. De las 87 cepas analizadas, 22/87 (25.28%) mostraron resistencia al cloranfenicol (30 µg), 15/87 (17.24%) a la ampicilina (10 µg) y 54/87 (62.07%) fueron resistentes al sulfametoxazol (60 µg). La relación fenotípica y genotípica de las 87 cepas analizadas fue: de las 22 cepas que presentaron resistencia fenotípica al cloranfenicol, sólo 14/22 (63.63%) expresaron el gen de resistencia *cmlA/tetR*, y de las 65 cepas que manifestaron sensibilidad al cloranfenicol, 36/65 (55.38%) expresaron el gen de resistencia *cmlA/tetR*. De las 15 cepas que expresaron resistencia a la ampicilina, sólo 2/15 (13.33%) mostraron el gen *PSE-1*, y 7/15 (46.66%) presentaron el gen *TEM*, ambos genes confieren resistencia genotípica a la ampicilina. De las 72 cepas que manifestaron sensibilidad a la ampicilina, 11 (15.27%) mostraron el gen *TEM*, el cual da resistencia a la ampicilina. De las 87 cepas de *Salmonella* sólo 2/87 (2.28%) expresaron el fagotipo DT104. Las cepas que son portadoras de genes de resistencia, pero no la manifiestan fenotípicamente, no han sido expuestas a una selección por competencia, por lo tanto, no expresan la resistencia fenotípica, pero cuentan con el mecanismo necesario para expresarla.

Palabras clave: *SALMONELLA* TYPHIMURIUM, RESISTENCIA, CERDOS, ANTIBIÓTICOS.

Recibido el 27 de septiembre de 2010 y aceptado el 26 de mayo de 2011.

*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco km 15.5, 50200, Toluca, México.

Responsable del artículo: Dr. Martín Talavera Rojas, Teléfono/Fax: 722 2965555 y 722 2965548, Correo electrónico: mtr0035@yahoo.com.mx

Introduction

Since *Salmonella* Typhimurium strains with chromosome resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracyclines (type R ACSSuT) appeared in the 1900's in the United Kingdom and later were distributed worldwide, they have become a problem to animal and public health due to the fact that treatments no longer have the expected effect.¹ Studies carried out between 1997 and 2003 in Taiwan, demonstrated the existence of multi-resistant strains of *Salmonella*;² the strains of *Salmonella* Typhimurium phagotype DT104 have shown multi-resistance to antibiotics such as ampicillin, chloramphenicol and sulfonamides.³⁻⁷ Genes related with said resistance are: *cmlA/tetR*, that gives resistance to chloramphenicol; *SipB/C*, that gives resistance to sulfonamides; *PSE-1* and *TEM*, that give resistance to ampicillin.^{8,9}

Currently, the presence of multi-resistant strains of *Salmonella* spp throughout the world, has created serious therapeutical problems since the antibiotics commonly used to treat the disease caused by it are no longer working or giving the desired results.¹⁰

The objective of this study was to identify the *cmlA/tetR*, *PSE-1*, *TEM*, *Sip B/C* genes that provide resistance to chloramphenicol, ampicillin and sulfonamides in *Salmonella* spp strains isolated from pigs in the Estado de Mexico.

Material and methods

Preparation of *Salmonella* isolates

The strains used in this study were obtained from slaughterhouse pigs that come from different states of the country, and are slaughtered in abattoirs in the Estado de Mexico (Table 1).

Phenotypic resistance

Evaluation of bacterial resistance to antimicrobial drugs was carried out by the Kirby-Bauer method according to the norms of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).¹¹

Extraction of bacterial DNA

A total of 3 ml of bacterial growth were centrifuged at 170 000 g. Then the supernatant was decanted and resuspended in 1 ml of PBS (phosphate buffer saline solution); washed 4 times and in the last wash the pellet was re-suspended with 1 ml of PBS, 3 µl of NaOH 1N

Introducción

La aparición de cepas de *Salmonella* Typhimurium con resistencia cromosómica a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclinas (tipo R ACSSuT) en los años 90 en el Reino Unido, y que posteriormente tuvieron una distribución mundial, ha causado una preocupación en la salud animal y la salud pública debido a que los tratamientos ya no tienen el efecto esperado.¹ Estudios realizados entre 1997 y 2003 en Taiwán, demostraron la aparición de cepas multirresistentes de *Salmonella*;² estas cepas de *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT104 han mostrado una multirresistencia a antibióticos como la ampicilina, cloranfenicol y sulfonamidas.³⁻⁷ Los genes relacionados con dicha resistencia son: *cmlA/tetR*, el cual proporciona resistencia al cloranfenicol; el *SipB/C*, que confiere resistencia a las sulfonamidas; el *PSE-1* y *TEM*, los cuales dan resistencia a la ampicilina.^{8,9}

En la actualidad, la presencia de cepas de *Salmonella* spp multirresistentes en todo el mundo, ha causado un gran problema en la terapéutica de esta enfermedad debido a que los antibióticos utilizados comúnmente ya no funcionan o no se obtienen los resultados deseados.¹⁰

El objetivo del presente trabajo fue identificar los genes *cmlA/tetR*, *PSE-1*, *TEM*, *Sip B/C* los cuales proporcionan resistencia al cloranfenicol, ampicilina y sulfonamidas en cepas de *Salmonella* spp aisladas de cerdos en el Estado de México.

Material y métodos

Preparación de los aislamientos de *Salmonella*

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de cerdos para abasto provenientes de varios estados del país, sacrificados en rastros del Estado de México (Cuadro 1).

Resistencia fenotípica

La evaluación de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos se realizará mediante el método Kirby-Bauer según lo establecen en la normativa del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).¹¹

Extracción del ADN bacteriano

Se obtuvieron 3 ml de crecimiento bacteriano, el cual fue centrifugado a 170,000 g. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de

CUADRO 1

Cepas de *Salmonella* spp aisladas de cerdos sacrificados en rastros del Estado de México
Salmonella spp strains isolated from slaughtered pigs at abattoirs in the Estado de Mexico

<i>Origin of the pigs</i>	<i>Serovar</i>	<i>Number of isolates</i>
ATCC 14028	Typhimurium	1
	Typhimurium	11
Guanajuato	Anatum	3
	Havana	2
	Other serovars	7
	Typhimurium	11
	London	13
	Bredeney	4
Michoacan	Agona	3
	Senftenberg	3
	Other serovars	6
	Typhimurium	10
Estado de Mexico	Agona	4
	Other serovars	2
	Typhimurium	4
Jalisco	Other serovars	3
Total		87

and 22 µl of Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM) and placed in a dry water bath at 90°C for 25 min; finally it was briefly centrifuged and kept frozen at -20°C, until its use.¹²

Preparation of reagents

Primer sequences that were used are described in Table 2.

The reaction consisted of 2.5 µl 10x PCR buffer, 1.5 µl of 25 mM MgCl₂, 1µl of 200 mM DNTs, 2 µl of each of the primers (*SipB/C*, *cmlA/tetR*, *PSE-1*, *TEM*, *DT 104*), 1 µl (1 unit/µl) of Taq DNA polymerase (Invitrogen/USA), 3 µl of bacterial DNA and 13 µl of injectable water. Reactions were pre-incubated at 95°C for 5 minutes, then 40 cycles were carried out with a denaturing temperature at 95°C for 1 minute, primer alignment at 48°C for 30 seconds and a DNA extension at 72°C for 30 seconds. At the end of the cycles, the reactions were incubated for 3 minutes at 72°C and later the temperature was taken to 4°C in order to stop the reaction.¹³

Electrophoresis was carried out in 3% agarose gel

PBS (Solución buffer fosfato salino); se lavó 4 veces y en el último lavado se resuspendió el comprimido con 1 ml de PBS (solución buffer de fosfatos), se le agregaron 3 µl de NaOH 1N y 22 µl de Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM) y se colocó en baño maría en seco a 90°C durante 25 min; por último se centrifugo brevemente y se conservó en congelación a -20°C, hasta el momento de su utilización.¹²

Preparación de las reacciones

Las secuencias de los iniciadores que se utilizaron se describen en el Cuadro 2.

La reacción consistió en 2.5 µl 10x de amortiguador de PCR, 1.5 µl de 25 mM MgCl₂, 1µl de 200 mM DNTs, 2 µl de cada *primers* (*SipB/C*, *cmlA/tetR*, *PSE-1*, *TEM*, *DT 104*), 1 µl (1 unit/µl) de Taq ADN polimerasa,* 3 µl de ADN bacteriano y 13 µl de agua inyectable, las reacciones se sometieron a una preincubación a 95°C por 5 minutos, posteriormente se realizaron 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización a

*Invitrogen, USA.

CUADRO 2

Iniciadores utilizados para la detección de los genes de resistencia por la técnica de PCR
Primers used in the detection of resistance genes by PCR technique

Primers	Sequence	PCR product (bp)
<i>SipB/C</i> ^a	5'-ACAGCAAAATGCGGATGCTT-3' 5'-GCGCGCTCAGTGTAGGACTC-3'	232
<i>cmlA/tetR</i> ^a	5'-CGCTCCTTCGATCCCCGT-3' 5'-GCTGCGTTCATCTACAACAGAT-3'	260
<i>PSE-1</i> ^a	5'-TTTGGTTCCGCGCTATCTG-3' 5'-TACTCCGAGCACCAAATCCG-3'	132
<i>TEM</i> ^a	5'-GCACGAGTGGGTACATCGA-3' 5'-GGTCCTCCGATCGTTGTCAG-3'	291
<i>DT104</i> ^b	5'-ATGCGTTTGGTCTCACAGCC-3' 5'-CTGAGGCCACGGATTTA-3'	102

^a Carlson *et al.*⁸; ^b Alvarez *et al.*⁹

with 5 µl of each reaction run for 45 minutes at 100 V with 1.5 µl load buffer (TBE 1x). The PCR products were visualized with ethidium bromide and exposed to a UV transilluminator.*¹³

Statistical analysis

Phenotypic and genotypic resistance frequencies were evaluated by means of epidemiological association using a 2 x 2 contingency table with a significance of $P < 0.05$, using relative risk (RR) and odds ratio (OR).^{14,15}

Results

Of the 87 analyzed strains, 2/87 (2.29%) had a 102 bp band, that corresponds to phagotype DT104; 50/87 (57.47%) expressed a 260 bp band that corresponds to the *cmlA/tetR* gene; 2/87 (2.29%) presented a 132 bp band that corresponds to the *PSE-1* gene, and 18/87 (20.68%) showed a band of 291 bp that corresponds to the *TEM* gene (Figures 1 and 2). In the analyzed strains, the 232 bp band that characterizes the *SipB/C* gene was not observed (Table 3).

Regarding the phenotypic-genotypic relation that was observed in this study, 22 strains were found to have phenotypical resistance to chloramphenicol of which 14 (63.63%) expressed the *cmlA/tetR* resistance gene, and of the 65 strains that showed phenotypical sensitivity to chloramphenicol, 36 (55.38%) had the resistance gene (Table 4).

Of the 15 strains that had resistance to ampicillin, 2 (13.33%) had the *PSE-1* gene and 7 (46.66%) expressed the *TEM* gene. Of the 72 strains that showed

95°C por 1 minuto, alineación de los *primers* a 48°C por 30 segundos y una extensión de ADN a 72°C por 30 segundos. Al finalizar los ciclos, las reacciones se incubaron por 3 minutos a 72°C y posteriormente se bajó la temperatura a 4°C para detener la reacción.¹³

Se tomaron 5 µl de cada reacción y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 3% por 45 minutos a 100 V con 1.5 µl de amortiguador de carga (TBE 1x). Los productos de PCR fueron visualizados con bromuro de etidio y fueron expuestos en un transluminador de UV.*¹³

Análisis estadístico

Las frecuencias de resistencia fenotípica-genotípica se evaluaron mediante medidas de asociación epidemiológica usando una tabla de contingencia de 2 x 2, con una significancia de $P > 0.05$, usando el riesgo relativo (RR) y razón de probabilidades (OR).^{14,15}

Resultados

De las 87 cepas analizadas, 2/87 (2.29%) mostraron una banda de 102 pb, correspondiente al fagotipo DT104; 50/87 (57.47%) expresaron una banda de 260 pb, correspondiente al gen *cmlA/tetR*; 2/87 (2.29%) presentaron una banda de 132 pb correspondiente al gen *PSE-1*, y 18/87 (20.68%) mostraron una banda de 291 pb, correspondiente al gen *TEM* (Figuras 1 y 2). No se observó la banda de 232 pb que caracterizan al gen *SipB/C* en las cepas analizadas (Cuadro 3).

*Transilluminator (transluminador) modelo M-20E. Marca Upland, CA91786, USA.

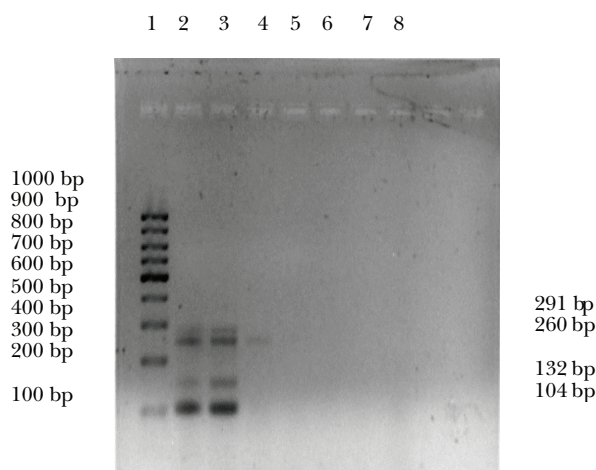


FIGURA 1. Banda diagnóstica del fagotipo DT104 y de los genes *cmlA/tetR*, *PSE-I* y *TEM* en gel de agarosa al 3%: 1. Marcador de peso molecular 100-1000 pb (Fermentas), 2. *S. Typhimurium* 22GMX1, 3. *S. Typhimurium* 11GZ2, 4. *S. Typhimurium* 23GT2, 5. *S. Typhimurium* 5BT1, 6. *S. Typhimurium* 17GZ2*, 7. *S. Typhimurium* 7GMT2, 8. *S. agona* 2GZ1.

FIGURE 1. Phagotype DT104 and *cmlA/tetR*, *PSE-I* and *TEM* genes diagnostic band in 3% agarose gel: 1. Molecular weight marker 100-1000 bp (Fermentas), 2. *S. Typhimurium* 22GMX1, 3. *S. Typhimurium* 11GZ2, 4. *S. Typhimurium* 23GT2, 5. *S. Typhimurium* 5BT1, 6. *S. Typhimurium* 17GZ2*, 7. *S. Typhimurium* 7GMT2, 8. *S. Agona* 2GZ1.

phenotypical *in vitro* sensitivity to ampicillin, 11 (15.28%) presented the *TEM* gene (Table 5).

Discussion

Of 87 analyzed strains, only 2 (2.98%) had the DT104 phagotype; presence of this phagotype in this study was very low, when compared to previous studies,^{9,16-20} which have reported a frequency above 50%. Nevertheless, it was observed that the presence of this phagotype was not related to the presence of genes that confer multiresistance.³

It was found that 57.41% of the strains were positive to the *cmlA/tetR* gene, of which 14 had phenotypical resistance to chloramphenicol. This indicates a positive association between the presence of the resistance gene and phenotypical resistance ($P < 0.05$). This gene is a fusion of two other genes, *cmlA* and *tetR*, which provide a genetic resistance specific to chloramphenicol according to the work carried out by Carlson *et al.*⁸ and Briggs and Fratamico,²¹ who found this gene in 10% and 97%, respectively. Both works were carried out using strains originating from diagnostics laboratories of countries such as the United States of America, United Kingdom and Germany. Nevertheless, another study carried out using strains isolated from food in Korea

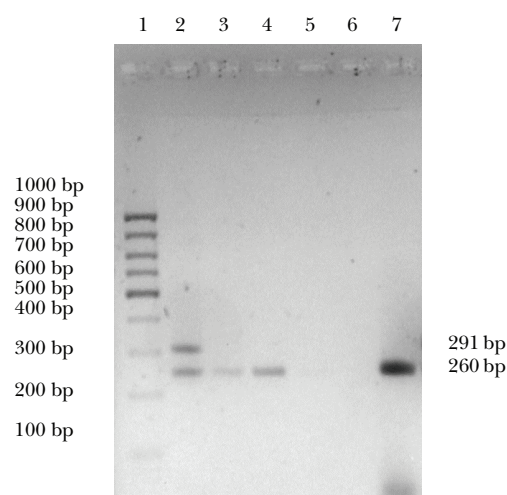


FIGURA 2. Banda diagnóstica de los genes *TEM* y *cmlA/tetR* en gel de agarosa al 3%: 1. Marcador de peso molecular 100-1000 pb (Fermentas), 2. *S. Typhimurium* 11GT1, 3. *S. Typhimurium* 22GMX1, 4. *S. Typhimurium* 20GT1, 5. *S. Typhimurium* 22GT1, 6. *S. Reading* 33GT2, 7. *S. Typhimurium* 9GMT2.

FIGURE 2. *TEM* and *cmlA/tetR* genes diagnostic band in 3% agarose gel: 1. Molecular weight marker 100-1000 bp (Fermentas), 2. *S. Typhimurium* 11GT1, 3. *S. Typhimurium* 22GMX1, 4. *S. Typhimurium* 20GT1, 5. *S. Typhimurium* 22GT1, 6. *S. Reading* 33GT2, 7. *S. Typhimurium* 9GMT2.

En cuanto a la relación fenotípica-genotípica realizada en el presente estudio, se encontró que de 22 cepas que mostraron resistencia fenotípica al cloranfenicol, 14 (63.63%) expresaron el gen de resistencia *cmlA/tetR*, y de 65 cepas que mostraron sensibilidad fenotípica al cloranfenicol, 36 (55.38%) mostraron el gen de resistencia (Cuadro 4).

De las 15 cepas que presentaron resistencia a la ampicilina, 2 (13.33%) mostraron el gen *PSE-I* y 7 (46.66%) expresaron el gen *TEM*. De 72 cepas que mostraron sensibilidad fenotípica a la ampicilina *in vitro*, 11 (15.28%) presentaron el gen *TEM* (Cuadro 5).

Discusión

De 87 cepas analizadas, sólo 2 (2.98%) fueron fagotipo DT104, la presencia de dicho fagotipo en este trabajo fue muy baja, en comparación con otros trabajos realizados,^{9,16-20} los cuales obtuvieron una frecuencia por arriba de 50%; sin embargo, se observa que la presencia de este fagotipo no se relaciona con la presencia de genes que confieren multiresistencia.³

Se observó que 57.41% de las cepas fueron positivas al gen *cmlA/tetR*, de las cuales 14 mostraron resistencia fenotípica al cloranfenicol; lo que indica una asociación positiva entre la presencia del gen de resistencia y la resistencia fenotípica ($P < 0.05$). Este gen

CUADRO 3

Análisis genotípico de cepas de *Salmonella* spp de cerdos de abasto de rastros del Estado de México
 Genotypic analysis of *Salmonella* spp strains isolated from pigs slaughtered at abattoirs in the Estado de Mexico

<i>Strains</i>	<i>No. strains</i>	<i>(cmlA/tetR)</i>	<i>(PSE-1)</i>	<i>(TEM)</i>	<i>(SipB/C)</i>	<i>Phagotype DT104</i>	<i>Negative</i>
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	1	1	0	0	0	0	0
<i>S. B Monofasica</i>	3	1	0	1	0	0	2
<i>S. Typhimurium</i>	36	16	2	7	0	2	20
<i>S. London</i>	15	9	0	2	0	0	6
<i>S. Cholerasuis</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>S. Anatum</i>	6	5	0	2	0	0	1
<i>S. Bredeney</i>	6	4	0	0	0	0	2
<i>S. Reading</i>	2	1	0	0	0	0	1
<i>S. Tennessee</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>S. Adelaida</i>	1	1	0	1	0	0	0
<i>S. Havana</i>	2	1	0	0	0	0	1
<i>S. Enteritidis</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>S. Agona</i>	7	4	0	3	0	0	3
<i>S. Infantis</i>	2	1	0	1	0	0	1
<i>S. Senftenberg</i>	3	3	0	1	0	0	0
Total	87	50 (57.47%)	2 (2.29%)	18 (20.68%)	0	2 (2.29%)	37 (42.52%)

CUADRO 4

Resistencia genotípica-fenotípica al cloranfenicol, en cepas resistentes y sensibles de *Salmonella* spp
 Genotypic-phenotypic resistance to chloramphenicol, in resistant and sensitive strains of *Salmonella* spp

<i>Resistant to chloramphenicol</i>	<i>Positive to cmlA/tetR</i>	<i>Sensitive to chloramphenicol</i>	<i>Positive to cmlA/tetR</i>
22	14 (63.63%)	65	36 (55.38%)

RR = 1.33 IC= 0.92 < RR 1.33 < 1.91.
 OR = 1.40 IC= 0.54 < OR 1.40 < 3.57.

CUADRO 5

Resistencia genotípica-fenotípica de cepas resistentes y sensibles de *Salmonella* spp a la ampicilina
 Genotypic-phenotypic resistance to ampicillin, in resistant and sensitive strains of *Salmonella* spp

<i>Resistant to ampicillin</i>	<i>Positive to PSE-1</i>	<i>Positive to TEM</i>	<i>Sensitive to ampicillin</i>	<i>Positive to PSE-1</i>	<i>Positive to TEM</i>
15	2(13.33%)	7(46.66%)	72	0	11(15.28%)

RR = 3.45 ^aIC= 1.68 < RR 3.45 < 7.07.
 OR = 4.84 ^aIC= 1.50 < OR 4.84 < 15.58.

did not show the presence of this gene.¹³ Currently, in Mexico, this drug is discontinued although there is another one of the same family known as florfenicol which has a similar mechanism of action. Regarding the strains that showed phenotypical resistance to chloramphenicol but did not have the *cmlA/tetR* gene, it is possible that this resistance is due to a gene known as *floR*, mentioned in the works of Weill *et al.*²² and Bolton *et al.*³ and provides resistance to florfenicol and chloramphenicol.

A total of 15 strains showed phenotypical resistance to ampicillin, of which 13.33% had the *PSE-1* gene, and 46.66% the *TEM* gene, while of the 72 strains that showed sensitivity to ampicillin only 15.27% had the *TEM* gene. Both genes are known to confer resistance to ampicillin,^{8,13} although other authors have stated that the *PSE-1* gene provides resistance to β -lactam drugs.^{23,24} The presence of genotypic resistance to ampicillin in strains isolated from pigs in slaughterhouses of the Toluca valley is low, but has been increasing in comparison to more developed countries.^{23,24} Furthermore, the presence of the *PSE-1* was very low when compared to the results obtained from strains isolated from food in Korea (26.7%).¹³ When compared to results obtained in France during the 1993-2003 period (70%) of strains isolated from humans, both results were much lower.²²

The *SipB/C* gene, which confers resistance to sulfas, was not found in the *Salmonella* spp strains analyzed in this study. Therefore, it stands to argue that the resistance seen in these strains (62.07%) is not linked to the presence of this gene but rather to another not analyzed in this study.

From the results shown in the genotype-phenotype relation it can be said that the phenotypically sensitive strains that had genotypic resistance were possibly not exposed to the drug, but it is important to point out that these strains have the resistance gene and that there is the possibility that these strains could express phenotypical resistance when exposed to specific drugs.²⁵

References

1. THRELFALL JE. Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT104- a truly international multiresistant clone. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 7-10.
2. CHIU CH, SU LH, CHU CH, WANG MH, YEH CM, WELLI FX *et al.* Detection of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Phage Type DT102, DT104, and U302 by Multiplex PCR. J Clin Microbiol 2006; 44: 2354-2358.
3. BOLTON FL, KELLEY CL, LEE DM, FEDORKA JP, MAURER JJ. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 based

es una fusión de dos genes: el *cmlA* y *tetR*, que le da una resistencia genética específica al cloranfenicol, según los trabajos realizados por Carlson *et al.*⁸ y Briggs y Fratalico,²¹ quienes encontraron este gen en un 10% y 97%, respectivamente; ambos trabajos se realizaron con cepas obtenidas de laboratorios de diagnóstico de algunos países, como Estados Unidos de América, Reino Unido y Alemania; sin embargo, en otro trabajo realizado en cepas aisladas de alimentos en Corea, no se presentó este gen.¹³ Actualmente, en México este fármaco se encuentra discontinuado, pero aún existe otro de la misma familia del cloranfenicol llamado florfenicol, el cual tiene un mecanismo de acción similar. En cuanto a las cepas que mostraron resistencia fenotípica al cloranfenicol, pero no manifestaron el gen (*cmlA/tetR*), probablemente la resistencia esté dada por otro gen llamado *floR*, mencionado en los trabajos de Weill *et al.*²² y Bolton *et al.*³ el cual confiere resistencia al florfenicol y al cloranfenicol.

Quince cepas mostraron resistencia fenotípica a la ampicilina, de las cuales 13.33% expresaron el gen *PSE-1*, y 46.66% el gen *TEM*, de las 72 cepas que mostraron sensibilidad a la ampicilina, 15.27% presentaron el gen *TEM*. Ambos genes confieren resistencia a la ampicilina.^{8,13} Aunque otros autores^{23,24} mencionan que el gen (*PSE-1*) confiere resistencia a los β -lactámicos. La presencia de resistencia genotípica a la ampicilina en cepas aisladas de cerdos de rastros del Valle de Toluca es baja, pero va en incremento en comparación con países más desarrollados.^{23,24} La presencia del gen *PSE-1* fue muy baja en comparación con los resultados obtenidos en cepas aisladas en Corea a partir de alimentos (26.7%),¹³ ambos resultados fueron mucho menores al observar los resultados obtenidos en Francia en el periodo 1993-2003 (70%) en cepas aisladas de humanos.²²

El gen *SipB/C*, que confiere resistencia a las sulfas, no estuvo presente en las cepas de *Salmonella* spp analizadas en el presente estudio; por lo tanto, se puede decir que la resistencia de estas cepas (62.07%) no está ligada a la presencia de este gen.

Por los resultados mostrados en la relación genotipo-fenotipo se puede afirmar que las cepas sensibles fenotípicamente y que mostraron resistencia genotípica, probablemente no han sido expuestas al fármaco, pero es importante señalar que estas cepas ya cuentan con el gen, es decir, que existe la posibilidad de llegar a expresar la resistencia fenotípica, por algún mecanismo codificado por estos genes en caso de una exposición.²⁵

on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. J Clin Microbiol 1999; 37: 1348-1351.

4. RABATSKY-Ehr T, WHICHARD J, ROSSITER S, HOLLAND B, STAMEY K, HEADRICK ML *et al.*

- Multidrug – resistant strains of *Salmonella enterica* Typhimurium, United States, 1997-1998. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 795-801.
5. HELMS M, ETHELBERG S, MOLBAK K. International *Salmonella* Typhimurium DT104 Infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 859-867.
 6. RIBOT EM, WIERZBA RK, ÁNGULO FJ, BARRETT TJ. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States 1985,1990, and 1995. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:387-391.
 7. YOKOYAMA E, MARUYAMA S, KABEYA H, HARA S, SATA S, KUROKI T *et al.* Prevalence and Genetic Properties of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Definitive phage Type 104 Isolates from *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* House Rats in Yokohama City, Japan. *Appl Envi Microbiol* 2007; 73: 2624-2630.
 8. CARLSON SA, BOLTON LF, BRIGGS CE, HURD HS, SHARMA V, FEDORKA PJ *et al.* Detection of multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. *Mol Cell Probes* 1999; 13: 213-222
 9. ALVAREZ J, SOTA M, VIVANCO AB, PERALES P, CISTERNA R, REMENTERIA A *et al.* Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1734-1738.
 10. LEE KE, LEE Y. Isolation of Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 from Swine in Korea. *J Microbiol* 2007; 45:590-592.
 11. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. 10 ed. Vol. 29, No. 3. Approved standard M100-S19. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2009.
 12. CHIU HC, OU TJ. Rapid Identification of *Salmonella* serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2619-2622.
 13. YANG SJ, PARK KY, SEOK KS, YOO HS, NOH KM, KIM SH *et al.* Multidrug- resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella enteritidis* identified by multiplex PCR from animals. *Vet Sci* 2001; 2: 181-188.
 14. DANIEL WW. Bioestadística (bases para el análisis de las ciencias de la salud). 4ª ed. México DF: Limusa Wiley, 2008.
 15. HIRD D, HERNÁNDEZ AJ, WILLIAMS JJ, RODRÍGUEZ BJC, SEGURA CJC. Medidas de asociación epidemiológica. Memorias del V Curso Internacional Teórico-Práctico en Epidemiología; 2000 noviembre 27 – diciembre 1; Mérida (Yucatán) México. Mérida (Yucatán) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán, 2000: 19-27.
 16. YU CY, CHOU JS, YEY MC, CHAO RC, HUANG CK, CHANG FY *et al.* Prevalence and Characterization of Multidrug-Resistant (Type ACSSu) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains in Isolates from Four Gosling Farms and a Hatchery Farm. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 522-526.
 17. GRAZIANI C, BUSANI L, DIONISI A, LUCARELLI C, OWCZAREK S, RICCI A *et al.* Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Vet Microbiol* 2008; 128: 414-418.
 18. FRAZAN A, FRIENDSHIP RM, POPPE C, MARTIN L, DEWEY CE, FUNK J. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Salmonella* Typhimurium DT104 on Ontario swine farms. *Can J Vet Res* 2008; 72:188-194.
 19. MIKO A, PRIES K, SCHROETER A, HELMUTH R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 1025-1033.
 20. RANDALL LP, COOLES SW, OSBORN MK, PIDDOCK LJV, WOODWARD MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistances in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 208-216.
 21. BRIGGS CE, FRATAMICO PM. Molecular Characterization of Antibiotic Resistance Gene Cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:846-849.
 22. WEILL FX, GUESNIER F, GUIBERT V, TIMINOUNI M, DEMARTIN M, POLOMACK L *et al.* Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993-2003). *J Clin Microbiol* 2006; 44: 700-708.
 23. KHAN AA, NAWAZ SM, KHAN AS, CERNINGLIA EC. Detection of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Letters* 2000; 182: 355-360
 24. WALSH C, DUFFY G, NALLY P, O'MAHONY R, MCDOWELL DA, FANNING S. Transfer of ampicillin resistance for *Salmonella* Typhimurium DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. *Lett Appl Microbiol* 2007; 46: 210-215.
 25. TALAVERA RM, VAZQUEZ CHJC, FLORES BR, ROBLES GF, LAGUNAS BS, ALONSO FMU. GyrA gene mutations and fluoroquinolone resistance in *Salmonella* isolates from pigs in central Mexico. *Vet Rec* 2007; 160: 630-632.