



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE
Salmonella spp. AISLADAS DE REPTILES EN CAUTIVERIO, REGIÓN
METROPOLITANA, CHILE**

Consuelo Alejandra Bittner Torrejón

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: DRA. CONSUELO BORIE POLANCO

SANTIAGO, CHILE
2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE
Salmonella spp. AISLADAS DE REPTILES EN CAUTIVERIO, REGIÓN
METROPOLITANA, CHILE**

Consuelo Alejandra Bittner Torrejón

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final:

FIRMA

PROFESORA GUÍA:	CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CORRECTOR:	CARLOS NAVARRO V.
PROFESORA CORRECTORA:	LISETTE LAPIERRE A.

SANTIAGO, CHILE
2016

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A mis padres, Jorge Bittner y Paulina Torrejón, por haberme dado la oportunidad de estudiar esta carrera, por la paciencia y el apoyo incondicional que me han brindado durante todos estos años de estudio y durante todo este proceso de desarrollo de la tesis. A mi hermano Felipe, por su colaboración en la corrección de esta memoria.

A mi profesora guía, Dra. Consuelo Borie, muchas gracias por el apoyo que siempre sentí de Ud. a lo largo de este año. Gracias por su incondicional presencia durante todo este estudio, su buena disposición, así como también sus consejos, críticas y sugerencias, ya que fueron estos los que me permitieron finalizar esta etapa con éxito.

A mis profesores correctores, Dra., Lisette Lapierre y Dr. Carlos Navarro, agradezco infinitamente el apoyo entregado durante el desarrollo de la investigación. Al Dr. Navarro le agradezco especialmente el tiempo que dedicó en ayudarme a superar los distintos obstáculos que surgieron en el camino, gracias por sus sugerencias y por sobre todo, su buen humor y palabras de aliento.

Al Dr. Nicolás Galarce, sin duda fue una inmensa ayuda en todo este proceso, gracias por la paciencia sobre todo en el periodo de inducción y por siempre tener la mejor disposición para ayudar y enseñar. Además quiero destacar su alegría y que junto con mis compañeros, hacía del trabajo en el laboratorio una experiencia muy grata.

A los doctores José Pizarro, Patricio Retamal, Marcela Fresno y Ana Jedlicky por los préstamos de materiales y colaboración en los momentos más críticos del desarrollo de esta tesis. Sin su ayuda, no habría logrado finalizar este estudio en el plazo correspondiente.

Al Dr. Cristian Bravo, por su excelente disposición para ayudar y sus buenas sugerencias.

A todos los funcionarios del Dpto. Medicina Preventiva Animal, agradezco de todo corazón su fundamental ayuda, sin la cual no habría sido posible desarrollar este estudio.

A mis compañeros de tesis, y futuros colegas, Sofía Salgado, Javier Masías, Francisco Carmona e Ignacio Silva. Gracias por ser el mejor grupo de trabajo que podría haber pedido y por sobre todo, gracias por la amistad.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

ÍNDICE DE CAPÍTULOS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1. Resistencia antimicrobiana en cepas de <i>Salmonella</i> spp. a nivel mundial:	4
1.1. Humanos y animales de producción	4
1.2. Animales silvestres y/o exóticos	6
1.3. Reptiles	7
1.3.1. Situación nacional	8
a) Casos de salmonelosis asociada a reptiles en Chile	8
b) Resistencia de <i>Salmonella</i> spp. aislada de reptiles en Chile	9
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICO	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Viabilidad y pureza	12
2. Identidad	12
- Prueba de aglutinación	12
- Propiedades bioquímicas	12
- Detección genómica de <i>Salmonella</i> spp.	12
3. Susceptibilidad antimicrobiana	14
4. Búsqueda de genes de resistencia	14
5. Análisis de datos	15
6. Normas de bioseguridad	15

RESULTADOS	16
1. Cepas bacterianas	16
1.1. Viabilidad y pureza	16
1.2. Prueba de aglutinación	16
1.3. Propiedades bioquímicas	16
1.4. Detección genómica de <i>Salmonella</i> spp.	16
2. Susceptibilidad antimicrobiana	17
3. Búsqueda de genes de resistencia	17
3.1. Resistencia a ampicilina	17
3.2 Resistencia a estreptomicina	18
3.3 Resistencia a tetraciclina	19
3.4 Resistencia a cloranfenicol	19
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIÓN	30
BIBLIOGRAFÍA	31
PLANIFICACIÓN	37
ANEXOS	38

ÍNDICE DE CUADROS

CUADROS		Pág.
1	Número de cepas de <i>Salmonella</i> no-tíficas aisladas de humanos y resistentes a distintos antimicrobianos, de un total de 2.344 cepas analizadas por el NARMS el año 2011.	5
2	Porcentajes de resistencia antimicrobiana de 125.673 cepas de <i>Salmonella</i> spp. en Europa, 2013.	5
3	Porcentajes de resistencia antimicrobiana de 3.087 cepas de <i>Salmonella</i> spp. de origen intestinal humano en Chile, periodo 2009-2013.	6

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1	Batería bioquímica típica del género <i>Salmonella</i> spp.	16
2	Gel de agarosa mostrando los amplicones generados por PCR (1.070 pb) correspondientes al gen <i>invA</i> .	17
3	Gel de agarosa mostrando los amplicones generados por PCR (608 pb) correspondientes al gen <i>blaTEM</i> .	18
4	Gel de agarosa mostrando bandeo inespecífico correspondiente al gen <i>aadA1</i> .	19

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno de gran importancia a nivel mundial, debido a sus consecuencias en la salud tanto humana como animal y también por las consecuencias económicas que genera. Entre las bacterias que presentan multiresistencia se encuentra *Salmonella* spp., patógeno distribuido mundialmente, generalmente transmitido por los alimentos, pero también por contacto directo o indirecto con sus reservorios animales. Dentro de estos, adquieren relevancia los reptiles por ser portadores asintomáticos de la bacteria, constituyendo un reservorio que cada vez adquiere mayor importancia debido a la creciente popularidad que presentan como mascota en las familias actuales.

En Chile existen escasos estudios sobre resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles que asocien genes a la resistencia fenotípica, razón por la cual, el objetivo del presente estudio apunta a la detección de genes de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles en cautiverio, en la Región Metropolitana en Chile. Para ello, se realizó una prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer y posteriormente, mediante la técnica de PCR, se buscaron 11 genes de resistencia en las cepas en análisis, independiente de su fenotipo. Dentro de los genes a detectar, 3 de ellos están asociados a resistencia a beta-lactámicos (*bla*TEM, *bla*OXA y *bla*PSE-1), 4 a resistencia frente a estreptomicina (*aad*A1, *aad*A2, *str*A y *str*B), 3 para resistencia a tetraciclinas (*tet*(A), *tet*(B), *tet*(C)) y un gen que confiere resistencia a cloranfenicol (*cm*IA).

Se observó una elevada sensibilidad fenotípica, donde el 23,5% de las cepas fue resistente a estreptomicina. De las 34 cepas analizadas, sólo se detectó el gen *bla*TEM en un 61,7%. El resto de las cepas resultaron negativas a la detección de los otros genes en análisis.

La alta sensibilidad detectada puede deberse a fenómenos de curación plasmidial, mutaciones cromosomales, regulación de la expresión génica, entre otros, como mecanismo de restauración del fitness bacteriano en cepas conservadas en un medio carente de presión selectiva.

Se concluye que las cepas analizadas presentan elevada sensibilidad fenotípica frente a beta-lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y estreptomicina, encontrando sólo cepas portadoras del gen *bla*TEM.

Palabras clave: reptiles, *Salmonella*, genes, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a phenomenon of great importance worldwide because of its impact on both human and animal health and the economic consequences it generates. Among resistant bacteria is *Salmonella* spp., worldwide distributed pathogen, usually transmitted by food, but also by direct or indirect contact with animal reservoirs. Within these, reptile become relevant because they are asymptomatic carriers of the bacteria, forming a reservoir that increasingly becomes more important due to the growing popularity as pets in today's families.

In Chile there are few studies on antimicrobial resistance in strains of *Salmonella* spp. isolated from reptiles that associated genes to phenotypic resistance, reason why the aim of this study points to the detection of antimicrobial resistance genes in strains of *Salmonella* spp. isolated from reptiles in captivity, in Región Metropolitana in Chile. For this, an antimicrobial susceptibility test, by Kirby-Bauer method was performed and subsequently, by PCR, 11 resistance genes were searched in strains tested, regardless of their phenotype. Among genes to detect, 3 of them are associated with resistance to beta-lactam (*bla*TEM, *bla*OXA and *bla*PSE-1), 4 to resistance to streptomycin (*aad*A1, *aad*A2, *str*A and *str*B), 3 for tetracycline resistance (*tet*(A), *tet*(B), *tet*(C)) and a gene conferring chloramphenicol resistance (*cml*A).

High phenotypic susceptibility was observed, where 23,5% of the strains were streptomycin resistant. Of the 34 strains tested, only *bla*TEM gene was detected in 61,7%. The remaining strains were negative for detection of the other genes analyzed.

High sensitivity detected may be due to a phenomenon of plasmidial healing, chromosomal mutations, gene expression regulation, among others, as a mechanism for restoring the bacterial fitness of strains preserved in a medium lacking of selective pressure.

It is concluded that strains tested possess high phenotypic sensitivity to beta-lactams, tetracyclines, chloramphenicol and streptomycin, finding strains carrying only the *bla*TEM gene.

Key words: reptiles, *Salmonella*, genes, antimicrobial resistance.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el aumento de cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes a los antibióticos (MRA) ha significado un problema en la medicina humana en todo el mundo, hecho que se ve reflejado en los cada vez más frecuentes fracasos en los tratamientos que han sido requeridos. Tratándose de una enfermedad con reservorio animal, es innegable la relevancia que cobra el estudio de este fenómeno de resistencia en medicina veterinaria, más aún cuando existe evidencia de la transmisión de la bacteria y de sus genes de resistencia hacia seres humanos.

Salmonella spp. es un enteropatógeno Gram negativo que puede infectar a una gran variedad de hospederos. Debido a su forma de transmisión y ubicuidad es que afecta a un gran porcentaje de personas cada año. Así, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, estima que aproximadamente 1,2 millones de enfermedades y 450 muertes ocurren debido a *Salmonella* no tifoidea anualmente en ese país (Scallan *et al.*, 2011).

La mayoría de los casos de salmonelosis están asociados a brotes de intoxicación alimentaria por ingesta de agua o alimentos contaminados. Por esta razón, las investigaciones en Latinoamérica y específicamente en Chile se han centrado en las enfermedades de transmisión alimentarias (ETAs), pero también puede haber transmisión entre personas y por exposición al ambiente o animales.

Los principales reservorios de *Salmonella* spp. son diversas especies animales que actúan como portadores asintomáticos y que generalmente son relacionados a animales de producción, pero lo cierto es que existen otras fuentes de contagio que por lo general son bastante subestimadas, como son los animales exóticos, dentro de los cuales destacan los reptiles. Así, en Estados Unidos, un 6% de las salmonelosis son adquiridas por contacto directo o indirecto con reptiles (Mermin *et al.*, 2004).

Los reptiles pueden ser portadores asintomáticos de una amplia variedad de serotipos de *Salmonella*, muchos de los cuales pueden afectar al hombre. Estos animales liberan la bacteria de forma intermitente a través de las heces, siendo además fácilmente colonizados por transferencia vertical y horizontal.

En Chile, hay estimaciones del nivel de portación en reptiles terrestres en cautiverio de un 60,4%. A pesar de esto, la investigación referente a la transmisión de *Salmonella* spp. por reptiles es escasa y debido a que cada vez son más las personas que adquieren estos animales como mascota, se podría suponer que en el futuro, el contagio de salmonelosis a través de reptiles podría aumentar. A esto se le suma la falta de información con respecto a las precauciones que se deben tener al manipular estos animales, sobre todo en el caso de niños menores de 10 años, mujeres embarazadas, ancianos y personas inmunocomprometidas, quienes presentan una mayor susceptibilidad a adquirir la enfermedad, pudiendo llegar a requerir ingreso hospitalario.

A nivel nacional, en cepas de *Salmonella* spp. provenientes de reptiles de dos centros de cautiverio de la Región Metropolitana, se ha demostrado una preocupante resistencia fenotípica a antibióticos de uso humano y veterinario, siendo un 55,17% del total de las cepas resistente al menos a un antimicrobiano, observándose cepas MRA. Sin embargo, no existen estudios relacionados a la detección de genes que confieren esta resistencia, lo cual es de gran importancia debido a que estos, mediante distintos mecanismos, son los principales gestores de resistencia en las bacterias.

Por ello, este estudio pretende determinar la presencia de genes de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. aisladas el año 2004 desde de reptiles en cautiverio de dos centros de la Región Metropolitana.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El desarrollo de cada nuevo antimicrobiano, es seguido por la aparición de resistencia al mismo. El desarrollo de resistencia es un proceso de evolución normal para los microorganismos, pero es acelerado por la presión selectiva ejercida por el uso generalizado y uso no apropiado de antimicrobianos en los seres humanos y animales. Además, las cepas resistentes son capaces de propagarse y diseminarse a otros hospederos. Por ello, la resistencia antimicrobiana (RAM) es un complejo desafío para la salud pública y animal, por cuanto ha generado que estas drogas se vuelvan menos eficaces o incluso ineficaces, lo que resulta en una emergencia sanitaria mundial, que supera rápidamente las opciones de tratamiento disponibles (OMS, 2014).

Cada año en los Estados Unidos, al menos 2 millones de personas son infectadas con bacterias que son resistentes a los antibióticos y al menos 23.000 personas mueren cada año directamente como resultado de estas infecciones (CDC, 2015). Debido a esto es que distintas organizaciones gubernamentales han tenido que tomar medidas al respecto, es así como se formó la alianza tripartita entre la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de la Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) quienes han definido tres campos prioritarios a abordar, dentro de los cuales se incluye la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

Se afirma que existe una necesidad por acercarse al concepto de “Una Salud”, enfrentando esta creciente amenaza con un enfoque integral y multisectorial, ya que los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas en animales pueden ser iguales o ser similares a los utilizados en los seres humanos. La RAM no reconoce fronteras geográficas ni humanas ni animales (OIE, 2015).

La resistencia antimicrobiana puede poseer una base intrínseca, es decir, la bacteria resiste la acción de cierta droga gracias a características estructurales o funcionales inherentes, o bien, tener una base adquirida por mutaciones y/o por transferencia horizontal de genes (THG), que luego son seleccionadas en la población por la presión selectiva ejercida por el uso o mal uso de antimicrobianos (Blair *et al.*, 2015; Brown-Jaque *et al.*, 2015).

La RAM adquirida puede conferirle a la bacteria tres mecanismos principales para sobrevivir (en conjunto o individualmente): 1) disminución de la concentración intracelular del antimicrobiano debido a una baja penetración dentro de la bacteria o por eflujo del antibiótico, 2) modificación del blanco del antibiótico por mutación génica o modificación postraduccional, y 3) inactivación del antibiótico por hidrólisis o modificación (Blair *et al.*, 2015).

A su vez, la mayoría de estos genes pueden propagarse por transferencia vertical de genes a la descendencia y por THG hacia bacterias del mismo o diferente género, mediante conjugación, transformación y transducción (Brown-Jaque *et al.*, 2015).

Debido a la facilidad con que ocurre lo anteriormente expuesto es que hoy se reconoce un alarmante aumento de la resistencia, particularmente en enterobacterias patógenas como es el caso de *Salmonella* spp., habiendo informes sobre cepas resistentes y multiresistentes en casi todos sus reservorios, tales como aves, mamíferos y reptiles.

1. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. a nivel mundial

1.1. Humanos y animales de producción:

En Estados Unidos el año 2011, se analizaron 2.344 cepas de *Salmonella* spp. aisladas de humanos, evaluados por el Sistema Nacional de Monitoreo de la Resistencia Antimicrobiana (NARMS). En el Cuadro N°1 se especifica el número de cepas resistentes ante algunos de los antimicrobianos analizados, observando los mayores porcentajes de resistencia frente a tetraciclina (10,5%), estreptomina (9,81%), y ampicilina (9,08%). Por otro lado, los serotipos predominantes en este estudio fueron *S. Enteritidis* (16,7%), *S. Typhimurium* (13,8%) y *S. Newport* (12,2%) (NARMS, 2011).

Cuadro N°1: Número de cepas de *Salmonella* no-tíficas aisladas de humanos y resistentes a distintos antimicrobianos, de un total de 2.344 cepas analizadas por el NARMS el año 2011.

Clase	Aminoglicósidos			Penicilinas	Fenicoles	Quinolonas		Tetraciclina
	GEN	KAN	STR	AMP	CLOR	CIP	NAL	TET
	40	39	230	213	103	4	57	245

*GEN= gentamicina; KAN= kanamicina; STR= estreptomina; AMP= ampicilina; CLOR= cloranfenicol; CIP=ciprofloxacino; NAL= ácido nalidíxico; TET= tetraciclinas.

En el Cuadro N°2 se detallan los porcentajes de resistencia de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de diferentes orígenes en Europa durante el año 2013 (EFSA, 2015). En este caso, se puede apreciar una alta resistencia a ampicilina en cerdos, pavos, bovinos y en el hombre; a ciprofloxacino y a ácido nalidíxico en pavos y pollos, y a sulfonamidas y tetraciclinas en todas las especies analizadas.

Cuadro N°2: Porcentajes de resistencia antimicrobiana de 125.673 cepas de *Salmonella* spp. en Europa, 2013.

<u>ANTIMICROBIANO*</u>	AMP	CEF	CLOR	CIP	NAL	SUL	TET
ORIGEN							
Humanos	36,1	1,4	6,8	3,8	14,4	35,7	34,5
Pollos	18,7	5,4	7,1	42,0	38,4	35,5	31,9
Cerdos	51,7	1,2	14,0	6,3	3,2	55,7	55,8
Pavos	48,1	0,5	11,8	55,0	41,1	52,8	64,1
Bovinos	37,4	0	9,7	7,9	6,6	43,2	38,3

*AMP= ampicilina; CEF= cefotaxima; CLOR= cloranfenicol; CIP=ciprofloxacino; NAL= ácido nalidíxico; SUL= sulfonamidas; TET= tetraciclinas.

En Chile, por otra parte, en el periodo de enero de 2009 a julio de 2014, se confirmaron 16.214 cepas de *Salmonella* spp. de origen clínico en humanos, donde el 65,3% de ellas correspondió a *S. Enteritidis*, y el 12,7% a *S. Typhimurium*. En el Cuadro N° 3 se muestran los porcentajes de resistencia de algunas de estas cepas (ISP, 2014). En términos generales, los porcentajes de resistencia de *Salmonella* aislada de cuadros

clínicos son bastante más conservadores que los porcentajes de resistencia en Europa, predominando la resistencia en el serotipo Typhimurium.

Cuadro N°3: Porcentajes de resistencia antimicrobiana de 3.087 cepas de *Salmonella* spp. de origen intestinal humano en Chile, periodo 2009-2013.

	<i>Salmonella</i> spp. (n=3.087)	S. Enteritidis (n=878)	S. Typhimurium (n=1.085)
ANTIMICROBIANO*	Porcentaje de resistencia (%)		
AMP	6	1	13
CEF	1	1	1
CIP	10	1	20
CLOR	5	0	11
CO	3	0	6
NAL**	11	2	27

*AMP= ampicilina; CEF= cefotaxima; CIP= ciprofloxacino; CLOR= cloranfenicol; CO=cotrimoxazol; NAL= ácido nalidíxico; **NAL= valores correspondientes solo al año 2013.

1.2. Animales silvestres y/o exóticos:

Matsuura *et al.*, (2010) en Perú, evaluaron la susceptibilidad de 40 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de 65 cuyes (*Cavia porcellus*), encontrando un 15,0% de resistencia a furazolidona, 12,5% a colistina, 7,5% a doxiciclina y oxitetraciclina y 5,0% a neomicina. Además, hubo susceptibilidad intermedia en un 2,5% a cloranfenicol, gentamicina y furazolidona, 7,5% a fosfomicina, 15% a colistina, 20% a doxiciclina, 25% a neomicina y un 42,5% a oxitetraciclina. Los autores sostienen que pudo haber habido resistencia cruzada entre los distintos componentes de la familia de las tetraciclinas analizadas en el estudio.

Fresno *et al.*, (2013) estudiaron la susceptibilidad de 46 aislados de *Salmonella* spp. de 758 aves acuáticas de Chile, siendo S. Enteritidis el serotipo más frecuente (70%). De los 46 aislados, 40 (86,9%) fueron resistentes a al menos un antimicrobiano, con la mayoría de ellos resistentes a la tetraciclina (74%). Se determinó que este fenotipo fue asociado a serotipo ($p < 0,01$). Cabe destacar que 21 (45,6%) de las 46 cepas, en su

mayoría perteneciente al serotipo Enteritidis, tenían fenotipo MRA, en un rango de 2 a 5 antimicrobianos.

Dougnac *et al.*, (2014) analizaron la susceptibilidad de 8 cepas de *Salmonella enterica* (tres *S. Agona* y cinco *S. Enteritidis*) aisladas de 2.114 muestras fecales de pingüinos magallánicos (*Spheniscus magellanicus*), detectando resistencia a ampicilina (12,5%), cefotaxima (12,5%), ceftiofur (37,5%) y tetraciclina (50%). Las resistencias a ceftiofur y a tetraciclina estaban asociadas ($p < 0,05$) con los serotipos *Agona* y *Enteritidis*, respectivamente. Una de las cepas fue MRA a tres de los cuatro antimicrobianos analizados.

1.3. Reptiles:

Pasmans *et al.*, (2005) aislaron 70 cepas de *Salmonella* spp. de 112 muestras provenientes de lagartos cautivos (62,5%). De estas cepas, 67 fueron sometidas a una prueba de susceptibilidad antimicrobiana frente a neomicina, tetraciclina, ampicilina, nitrofurantoína, espectinomicina, trimetoprim, sulfonamidas, cloranfenicol, gentamicina, apramicina, flumequina, amoxicilina + ácido clavulánico, enrofloxacino, colistina y ceftiofur. Dos cepas (1,7%), (*S. Enteritidis* y *S. Amsterdam*) mostraron resistencia sólo a nitrofurantoína, siendo el resto de las cepas sensibles a todos los antimicrobianos analizados.

Chen *et al.*, (2010), aislaron *Salmonella* en 147 (30,9%) de 476 reptiles (serpientes, lagartos y tortugas), obteniendo un total de 358 aislados. Los serotipos identificados más frecuentemente fueron *S. Heron* (8,9%), *S. Bredeney* (7,8%), *S. Typhimurium* (5,0%), y *S. Treforest* (5,0%). Los porcentajes más altos de resistencia se observaron frente a estreptomina (14,7%) y tetraciclina (9,2%). *S. Typhimurium* fue el serotipo con mayor resistencia antimicrobiana (>60%) frente a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina, ácido nalidíxico y cefalotina. Aunque ninguna de las cepas de *S. Typhimurium* fue resistente a fluoroquinolonas, 61,1% de ellas fueron resistentes al ácido nalidíxico, evento importante debido a que la resistencia a quinolonas es un paso previo a la resistencia frente a las fluoroquinolonas (Fàbrega *et al.*, 2009). Se encontró que 24 (6,9%) de las cepas presentaron MRA a 4 o más antimicrobianos distintos.

En Colombia, Pachón *et al.*, (2011) determinaron la sensibilidad antimicrobiana de 17 cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde estanques con caimanes del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) y tortugas (orden Testudines). El 23,5% de las cepas fueron resistentes a ampicilina, 29,4% a cefoxitin, 23,5% a cloranfenicol, 29,4% a sulfametoxazol-trimetoprim, y 11,7% a tetraciclina. El 76,4% de los aislados presentaron sensibilidad intermedia a tetraciclina.

Como se puede apreciar, la resistencia antimicrobiana está ampliamente distribuida en bacterias provenientes tanto del hombre como de los animales, sean estos de producción, exóticos o silvestres. Así, de acuerdo a los datos expuestos, se puede observar que en general, los antimicrobianos ante los cuales existen mayores niveles de resistencia corresponden a las tetraciclinas, seguido por ampicilina y quinolonas, siendo la multiresistencia un fenómeno bastante común entre los aislados de *Salmonella* spp.

1.3.1. Situación nacional:

a. Casos de salmonelosis asociada a reptiles en Chile.

El año 2012, el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) confirmó el primer caso de *Salmonella* del serotipo Fluntern en el país, tras recibir una cepa aislada de una menor de seis meses de edad. Este serotipo es transmitido principalmente por reptiles, que afectan a los seres humanos aunque no necesariamente a los animales (ISP, 2012).

Braun *et al.*, (2015) describieron tres casos de gastroenteritis por *Salmonella* spp. en tres lactantes asociadas a contacto con tortugas acuáticas (*Trachemys scripta elegans*), detectados en el Hospital Militar en Santiago, siendo posible aislar la bacteria desde las deposiciones de los tres pacientes y de dos de las cuatro tortugas estudiadas. La cepa del primer paciente fue identificada como *S. Montevideo*; los aislados del segundo niño y su tortuga correspondieron a *S. Newport* y los del tercer paciente y su tortuga, a *S. Pomona*. Todas las cepas fueron sensibles a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, cloranfenicol y a ciprofloxacino excepto en el segundo caso, en que la cepa mostró susceptibilidad intermedia a esta quinolona. Cabe destacar que hubo un nexo genético entre las cepas de cada paciente con su tortuga, determinado por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (por sus siglas en inglés PFGE), y además hubo familiares con

signología clínica de salmonelosis, por lo tanto se entiende que hubo diseminación de la bacteria.

En Valdivia, Toledo, (2009) aisló *Salmonella* spp., en tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) en un 13% (3/23) de las muestras cloacales analizadas. Se concluyó que la gran mayoría de los dueños desconoce la zoonosis, y que la venta de tortugas es una actividad importante dentro de las tiendas de mascotas, siendo vendidas sin restricción o recomendación por personas que desconocen esta enfermedad. Es por esta razón, que se debería tener más en cuenta a los reptiles como fuente de salmonelosis, ya que considerando los casos mencionados anteriormente, en Valdivia la salmonelosis asociada a reptiles podría estar siendo subestimada.

b. Resistencia de *Salmonella* spp. aislada de reptiles en Chile.

En Chile, son escasos los estudios publicados sobre susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles. El único estudio que existe a la fecha fue realizado por Sobarzo, (2004) quien trabajó con reptiles en cautiverio provenientes de dos centros de la Región Metropolitana. Se analizaron 96 reptiles a partir de los cuales se aisló *Salmonella* spp. en 58 de ellos (60,4%), con los siguientes porcentajes de aislamiento según tipo de reptil: 40,9% para tortugas (orden Testudines), 74,4% para lagartos e iguanas (orden Squamata sub orden Sauria) y 54,8% para serpientes (orden Squamata sub orden Ophidia). En los caimanes (orden Crocodylia) no se aisló la bacteria. Se detectó un 55,17% de cepas resistentes a al menos un antimicrobiano, destacando la resistencia frente a estreptomycin (46,5%); valores muy inferiores se obtuvieron frente a oxitetraciclina (6,9%) y a ácido nalidíxico (5,1%). Igual porcentaje de cepas resistentes (1,7%) se observó frente a cloranfenicol, amoxicilina, ciprofloxacino y flumequina. Solo un 10,3% de las cepas fueron MRA, presentando resistencia a dos antimicrobianos con los siguientes perfiles: estreptomycin + oxitetraciclina, estreptomycin + ácido nalidíxico, estreptomycin + cloramfenicol, estreptomycin + amoxicilina, oxitetraciclina + ciprofloxacino y ácido nalidíxico + flumequina. Particularmente interesante resulta la RAM a estreptomycin, ya que fue la droga de mayor uso en reptiles en los dos centros mencionados desde donde fueron obtenidas las cepas de *Salmonella* spp. (Borie, 2015¹).

¹ Borie, Consuelo. 2015. [Comunicación personal]. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Con todos los datos expuestos, se puede concluir que las resistencias antimicrobianas más frecuentes en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles son frente a: ampicilina, tetraciclina, estreptomycin, ácido nalidíxico y sulfonamidas.

El mecanismo genético que se asocia a estas resistencias específicas ha sido bastante estudiado y actualmente se reconocen diversos genes bacterianos que dan cuenta de ello. Por ejemplo, algunos genes asociados a resistencia a antibióticos beta-lactámicos que codifican para enzimas beta-lactamasas son el gen *bla*TEM (Chuanchuen y Padungtod, 2009), que confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas (Abarca y Herrera, 2001), el gen *bla*PSE-1 (Chuanchuen y Padungtod, 2009) que confiere resistencia a penicilinas y carbenicilinas (Abarca y Herrera, 2001), y el gen *bla*OXA (Lapierre *et al.*, 2010) que confiere resistencia a penicilinas y cloxacilinas (Abarca y Herrera, 2001).

En cepas de *Salmonella* spp. resistentes a ácido nalidíxico y cloranfenicol, se han detectado los genes *acrB* (Randall *et al.*, 2005) y *cmiA* (Chuanchuen y Padungtod, 2009) respectivamente, que codifican para bombas de eflujo, al igual que los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)* que confieren resistencia a tetraciclinas (Matayoshi *et al.*, 2015). En cepas resistentes a sulfonamidas se han detectado los genes *sul1* y *sul2*, que codifican para una enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS) insensible que no se une a este antimicrobiano (Frye y Jackson, 2013). Algunos de los genes presentes en cepas de *Salmonella* spp. que confieren resistencia a estreptomycin son *strA*, *strB*, *aadA1* y *aadA2*, y codifican para enzimas modificadoras de aminoglicósidos (Chuanchuen y Padungtod, 2009).

Este estudio pretende hacer una primera aproximación al conocimiento del genotipo de resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* aisladas de reptiles, en el territorio nacional, específicamente en la Región Metropolitana.

OBJETIVO GENERAL

Detectar genes de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles en cautiverio, Región Metropolitana, Chile

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Detectar genes de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. con fenotipo sensible y resistente frente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin y tetraciclina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el estudio se utilizó un cepario constituido por 58 cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles por Sobarzo en el año 2004, provenientes de dos centros de confinamiento de la Región Metropolitana, Chile (Anexo 1). A estas cepas se les comprobó:

1. **Viabilidad y pureza:** Se realizó aislamiento de las cepas mediante siembra en agar Tripticasa de Soya (TSA, Difco®), comprobando su pureza de acuerdo al tipo y aspecto de las colonias. Posteriormente, para comprobar la identidad de las cepas, se realizó otra siembra en agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD, Difco®) y se seleccionaron las colonias sospechosas (transparente con centro negro).
2. **Identidad:**
 - **Prueba de aglutinación:** Se realizó una prueba de reacción antígeno-anticuerpo con antisuero Poli A-I y Vi (Difco®) a las colonias sospechosas, siguiendo la técnica recomendada por el fabricante. Para ello, a partir de un cultivo en medio no selectivo, se transfirió una asada de cultivo a una gota de solución salina estéril al 0,85%. Una vez homogeneizada, se agregó una gota del antisuero y se volvió a homogeneizar por un minuto. Se consideraron positivas a aquellas cepas en que se observó un puntillado (reacción de aglutinación) luego de un minuto, mientras que en las que no se observó dicha reacción, fueron consideradas negativas.
 - **Propiedades bioquímicas:** se consideró la utilización de una batería corta para detección de *Salmonella* spp., que incluyó la prueba de crecimiento en agar citrato de Simmons (Difco®), producción de indol a partir de la desaminación del triptófano, desaminación de la fenilalanina (Difco®) y metabolización de la glucosa y lactosa en Agar Hierro de Kligler (KIA) (Difco®). Luego de sembrar en los medios de cultivo para las propiedades diferenciales correspondientes, se incubaron a 37°C por 24 horas, para luego proceder a su interpretación de acuerdo a protocolos del Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (LABFAVET).
 - **Detección genómica de *Salmonella* spp.:** Todas las cepas fueron sometidas a una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar el gen

invA, como marcador génico de género, de acuerdo al protocolo y partidores propuestos por Skyberg *et al.*, (2006) (Anexo 3). La extracción de DNA se realizó a través de un protocolo de ebullición a partir de 5 colonias crecidas en agar común o en su defecto, asadas de bacterias de cada tubo del cepario en tubos Eppendorf con 400 µL de agua libre de nucleasas hasta obtener turbidez, posteriormente se llevaron a ebullición en un baño termostático (Mermet®) por 15 minutos y finalmente se centrifugaron en una centrífuga Microspin 24S (Sorvall®) por 5 minutos a 15.000 rpm, recolectando el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf. Los tubos con ADN extraído, se almacenaron a temperatura de congelación (-18°C), hasta su uso.

Una vez obtenido el material genético, se mezcló 15 µL de PCR Master Mix 2X (Thermo scientific®), el cual contiene la enzima Taq DNA polimerasa (0,05 U/µL), desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs) (0,4mM), buffer de reacción y MgCl₂ (0,4mM), con 5 µL de DNA extraído y 5 µL de cada primer específico para *invA*, en concentraciones de 1µM (Anexo 2). Para realizar la PCR se utilizó un termociclador Apollo Instruments®, modelo ATC201, programado para realizar los siguientes ciclos: 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 66,5°C y dos minutos a 72°C, con un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72°C.

Como control positivo se utilizó la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028S, ya que esta cepa contiene el gen *invA* y como control negativo, la cepa de *E. coli*. ATCC 25922, debido a que esta bacteria no contiene dicho gen. Luego de realizar la PCR, se llevó a cabo la electroforesis (a 90 V y 25 mA), durante 90 minutos, en gel de agarosa (Bioline®) al 2% en buffer Tris Acetato EDTA 1x (Fermentas®). Para realizarla, se mezclaron 5 µL de producto de PCR con 1 µL de un producto comercial de carga (6X Mass Ruler Loading Dye Solution, Fermentas®). Se utilizó un marcador de tamaño molecular (Invitrogen®) que contiene fragmentos de ADN entre los 50 y 1.000 pb y como control de carga se utilizó suero fisiológico estéril. Se tiñó el gel de agarosa mediante incubación en Bromuro de Etidio (Sigma®) (0,5 µg/mL), durante 40 minutos, para poder visualizar el amplificado de 1.070 pb a través de un transiluminador de luz UV (Transiluminador UVP®), utilizando gafas de lectura apropiadas y guantes desechables.

- 3. Susceptibilidad antimicrobiana:** Se procedió a corroborar el fenotipo de resistencia señalado por Sobarzo (2004) en todas las cepas viables, mediante el método Kirby-Bauer estandarizado por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2013). Se utilizaron los siguientes antimicrobianos: estreptomicina (BBL™, 10µg), tetraciclina (BBL™, 30µg), ampicilina (Oxoid, 10µg) y cloranfenicol (BBL™, 30µg).

Cada cepa fue cultivada en caldo Tripticasa de Soya a 37°C por 18 horas, se ajustó su concentración al tubo 0,5 del nefelómetro de McFarland, y posteriormente se inoculó la superficie completa de una placa de agar Müeller-Hinton (Difco®) de 4mm de espesor, mediante una tórula estéril. Posteriormente se dejaron secar para luego colocar los sensidiscos comerciales, en forma equidistante entre ellos. Las placas se incubaron a 37°C por 18-24 horas para luego proceder a la lectura en milímetros de los halos de inhibición mediante un vernier de precisión. Para determinar sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia, se utilizaron los valores de los puntos de corte establecidos por el CLSI veterinario (2008) para tetraciclina, cloranfenicol y ampicilina; y el CLSI humano (2013) para estreptomicina. La cepa control utilizada fue *E. coli* ATCC 25922.

- 4. Búsqueda de genes de resistencia:** Una vez corroboradas las resistencias fenotípicas se determinó la presencia del gen o genes asociados, mediante protocolos de PCR descritos por Toro *et al.*, 2005; Chuanchuen y Padungtod, 2009 y Adesiji *et al.*, 2014 (Anexo 3). Para cada uno de los fenotipos se buscaron los siguientes genes de resistencia:

- **Resistencia a ampicilina:** *bla*TEM, *bla*PSE-1 y *bla*OXA.
- **Resistencia a estreptomicina:** *strA*, *strB*, *aadA1* y *aadA2*.
- **Resistencia a tetraciclina:** *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)*.
- **Resistencia a cloranfenicol:** *cmIA*.

Se utilizaron como cepas controles *S. Typhimurium* ATCC 14028S (para el gen *aadA*) y para el resto de los genes se utilizaron cepas de *Salmonella* spp. resistentes

fenotípicamente, gentilmente donadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y analizadas por el Dr. Nicolás Galarce (FAVET).

5. Análisis de datos:

Los resultados se presentan en forma descriptiva como porcentaje de genes en el total de cepas en análisis, sin hacer relación al tipo de reptil, ya que no hay información asociada al cepario.

6. Normas de bioseguridad:

Para llevar a cabo el estudio, los procedimientos se realizaron bajo las normas correspondientes al nivel de bioseguridad N° 2 para *Salmonella* no tíficas, de acuerdo al manual de bioseguridad disponible en Conicyt (Conicyt, 2008). Dentro de estas medidas se encuentran el uso obligatorio de guantes de látex, mangas plásticas desechables, delantal y gabinete de bioseguridad para la manipulación de la bacteria. Por otra parte, todos los medios de cultivo y el instrumental fueron autoclavados en dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET). Para el caso particular de la visualización de los productos de PCR, se utilizaron guantes desechables (para evitar contacto con el Bromuro de Etidio) y gafas protectoras (para proteger al operador de la lámpara de luz UV). Finalmente, los geles de agarosa incubados en Bromuro de Etidio, fueron incinerados en las dependencias de FAVET.

RESULTADOS

1. Cepas bacterianas:

1.1. Viabilidad y pureza: De las 58 cepas, sólo 34 fueron viables y constituyeron la población en análisis.

1.2. Prueba de aglutinación: De las 34 cepas viables, 14 (41%) aglutinaron con el suero Poli A-I y Vi.

1.3. Propiedades bioquímicas: Un 78% (27/34) de las cepas presentaron una batería bioquímica típica (Figura N°1), mientras que el 22% (7/34) restante tuvo propiedades bioquímicas atípicas, tales como no utilizar citrato como única fuente de carbono (2 cepas), fermentación de lactosa (1 cepa) y capacidad de desaminar el triptófano con producción de indol (4 cepas).

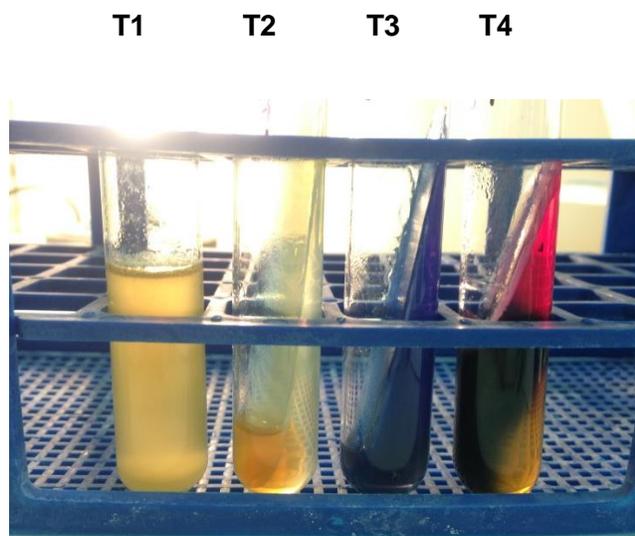


Figura N°1: Batería bioquímica típica del género *Salmonella* spp. T1: indol (negativo); T2: fenilalanina (negativo); T3: citrato (positivo) y T4: glucosa (positivo, amarillo), lactosa (negativo, rojo) y H₂S (precipitado negro).

1.4. Detección genómica de *Salmonella* spp.: A la totalidad de las cepas se les detectó el gen *invA* (Figura N°2).

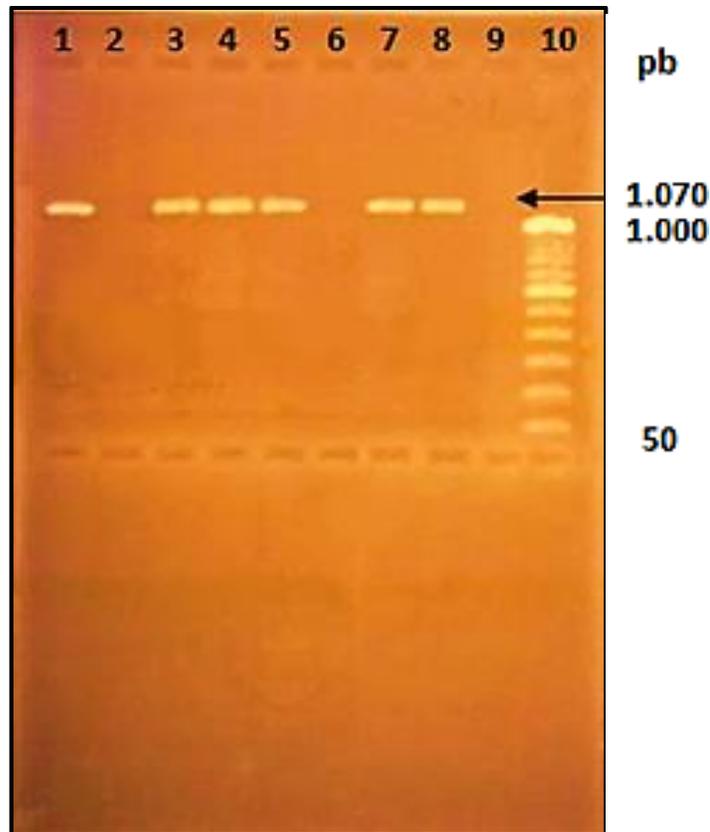


Figura N° 2: Gel de agarosa mostrando los amplicones generados por PCR (1.070 pb) correspondientes al gen *invA*. Carril 1: control positivo; Carril 2: control negativo; Carril 3: cepa 3; Carril 4: cepa 5; Carril 5: cepa 6; Carril 7: cepa 11; Carril 8: cepa 12; Carril 9: Control de reactivos; Carril 10: marcador de tamaño molecular (50 a 1000 pb).

2. Susceptibilidad antimicrobiana: El 20,5% (7/34) de las cepas en estudio mostraron sensibilidad intermedia a estreptomicina, y una sola cepa fue resistente. Tomando en cuenta las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2013), todas las cepas con susceptibilidad intermedia fueron consideradas como resistentes, por lo que en total, un 23,5% (8/34) de las cepas se consideraron resistentes a este antimicrobiano. Para el resto de los antimicrobianos, todas las cepas fueron sensibles.

3. Búsqueda de genes de resistencia:

3.1. Resistencia a ampicilina: Los genes *blaPSE-1* y *blaOXA* no fueron detectados en las cepas analizadas, mientras que el gen *blaTEM* fue detectado en 21 de las 34 muestras procesadas (61,7%). Las bandas obtenidas se ubicaron en las 600 pb, observándose nítidas y de grosor considerable (Figura N°3).

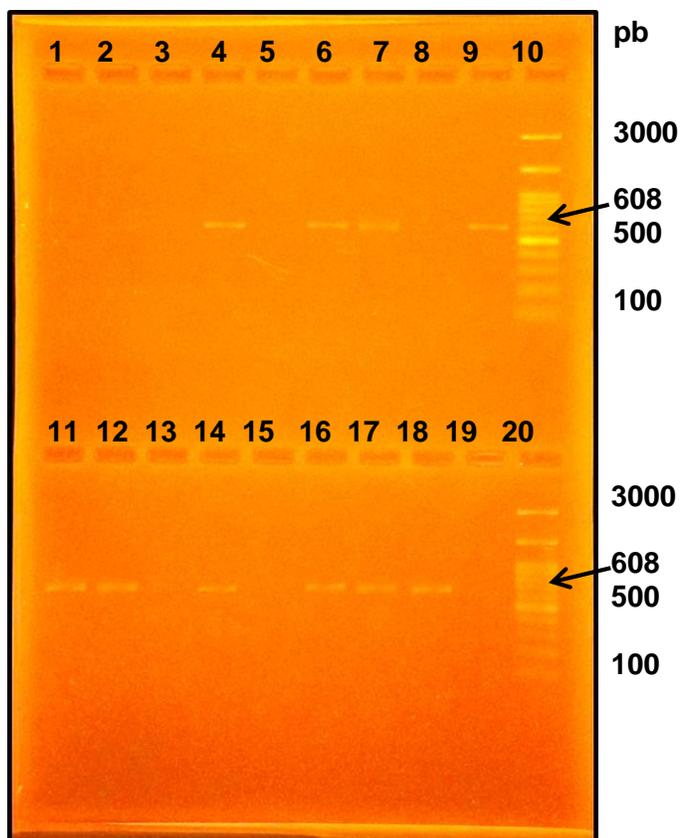


Figura N°3: Gel de agarosa mostrando los amplicones generados por PCR (608 pb) correspondientes al gen *bla*TEM. Carril 1: cepa 3; Carril 2: cepa 5; Carril 3: cepa 6; Carril 4: cepa 9; Carril 5: cepa 10; Carril 6: cepa 11; Carril 7: cepa 12; Carril 8: cepa 13; Carril 9: cepa 14; Carril 10: Marcador de tamaño molecular (100 a 3000 pb); Carril 11: cepa 15; Carril 12: cepa 16; Carril 13: cepa 18; Carril 14: cepa 20; Carril 15: cepa 21; Carril 16: cepa 22; Carril 17: cepa 23; Carril 18: control positivo; Carril 19: control negativo; Carril 20: marcador de tamaño molecular (100 a 3000 pb).

3.2. Resistencia a estreptomicina: Los genes *strA*, *strB* y *aadA2* no fueron detectados en las cepas analizadas. En el caso particular del gen *aadA1*, con los partidores utilizados se observaron al menos 3 bandas inespecíficas en todas las cepas, donde en 7 de ellas, una de las bandas correspondió al tamaño del amplicón buscado (631 pb). Debido a lo anterior es que se utilizó un termociclador en gradiente obteniéndose las mismas bandas inespecíficas, por lo que las cepas no fueron consideradas positivas (Figura N°4).

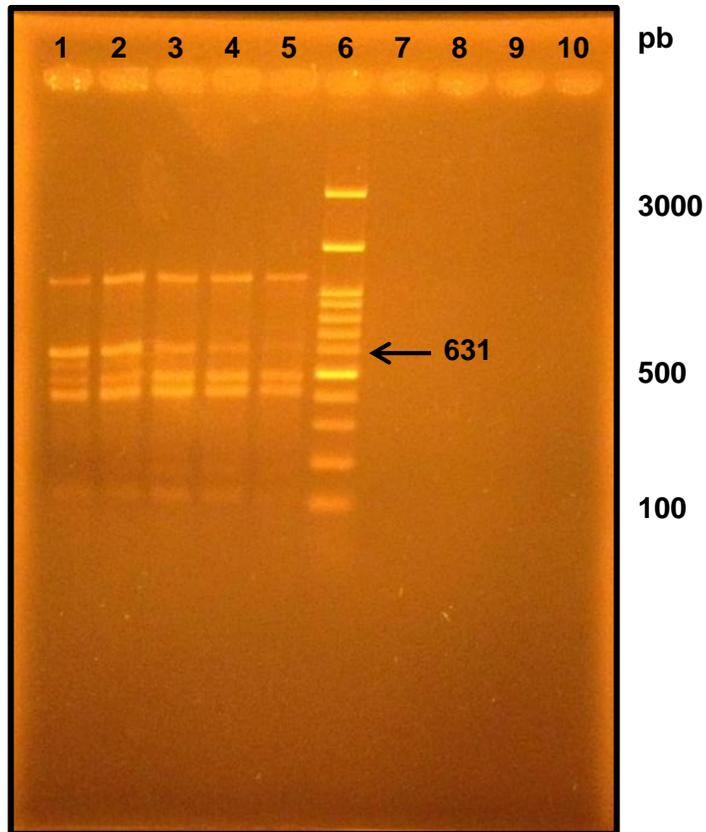


Figura N°4: Gel de agarosa mostrando bandeo inespecífico correspondiente al gen *aadA1*. Carril 1: cepa 18 a 55°C; Carril 2: cepa 18 a 57,4°C; Carril 3: cepa 18 a 60,3°C; Carril 4: cepa 18 a 62,3°C; Carril 5: cepa 18 a 65°C; Carril 6: MT (100 a 3000 pb).

3.3. Resistencia a tetraciclina: Los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)* no fueron detectados en las cepas analizadas.

3.4. Resistencia a cloranfenicol: El gen *cmIA* no se detectó en ninguna de las cepas en análisis.

DISCUSIÓN

La aglutinación con sueros mono y polivalentes contra el antígeno O del LPS de pared celular constituye un importante complemento de la identificación bioquímica para el género *Salmonella* spp., permitiendo identificar serogrupos (ISO, 2002). En este estudio, un 41% de las cepas fueron positivas a la reacción de aglutinación, lo cual es un porcentaje interesante, considerando que se utilizó un antisuero que abarca algunos de los serogrupos de *Salmonella* spp. (A al I y Vi), que incorpora aquellos serotipos de aislamientos frecuentes en los seres humanos, tales como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Caffer y Terragno (2001) afirman que según el esquema de Kauffmann-White, existen 67 serogrupos basados en el antígeno somático O, desde el grupo A hasta el Z y luego continúa con números, desde el O:51 hasta el O:67, lo que significa que el 59% de cepas que no aglutinaron con el antisuero polivalente utilizado en este estudio, probablemente pertenece a los serogrupos restantes.

Respecto de las cepas con batería bioquímica atípica, en la literatura se observa que es frecuente esta situación. Así, Caffer y Terragno, (2001) describieron que un 75% de las cepas de *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae* son fermentadoras de lactosa, mientras que para la subespecie *indica*, la fermentación de este carbohidrato es variable. Asimismo, existen también diferencias en las pruebas bioquímicas entre los distintos serotipos de *Salmonella* spp., por ejemplo entre el serotipo Paratiphy y Tiphy. De la misma manera el ISP también indica que existen cepas de *Salmonella* spp. que fermentan la lactosa (ISP, 2009)

En cuanto a la corroboración genómica del género *Salmonella* spp. se buscó el gen *invA*, gen de virulencia y reconocimiento del hospedero, ya que presenta una inclusividad para una amplia gama de serotipos de *Salmonella* (99,6%), incluyendo todas las subespecies; y una alta exclusividad (100%) para otras especies y géneros, además se propone como un estándar internacional (Malorny *et al.*, 2003). Todas las cepas en análisis (100%) presentaron el gen *invA*, mismo resultado obtenido por Skyberg *et al.*, (2006), por lo que pareciera ser que es un gen altamente específico del género *Salmonella* spp., o en otras palabras, es un buen marcador génico del género. Sin embargo, cabe destacar que no siempre se detecta este gen en la totalidad de las cepas

en estudio, pudiendo existir un porcentaje de cepas que no presenten el gen *invA*, tal como le sucedió a Malorny *et al.*, (2003) quienes sostienen que aquellas cepas pueden no ser invasivas, o utilizar mecanismos de invasión alternativos. Este gen no es el único gen de virulencia que presenta *Salmonella* spp., existiendo otros que también son marcadores génicos de género, tales como *orgA*, *sopB*, entre otros (Skyberg *et al.*, 2006).

En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana fenotípica obtenida por Sobarzo el año 2004, llamó la atención la disparidad con los resultados de este estudio, ya que en ese año se obtuvo un 55,7% de las cepas con resistencia a al menos un antimicrobiano, un 46,5% de estas cepas resistentes lo fueron a estreptomycin y además, obtuvo un 10,3% de cepas multirresistentes. En este estudio solamente se obtuvo un 23,5% de cepas resistentes en total, y todas ellas lo fueron frente a la estreptomycin. No se obtuvieron cepas multirresistentes.

Para explicar esto es importante recordar que los antimicrobianos atacan importantes funciones de la bacteria tales como síntesis de pared celular, regulación del superenrollamiento cromosomal, transcripción de ARN y síntesis proteica. Debido a esto, no es de sorprender que las bacterias resistentes por mutación o THG, usualmente sufran de una disminución en el fitness biológico (Andersson y Hughes, 2010), ya que la expresión de la resistencia antimicrobiana requiere de recursos energéticos y/o compromete las funciones metabólicas normales de las células (Andersson y Levin, 1999). Teniendo esto en consideración, la gran diferencia entre la resistencia fenotípica obtenida por Sobarzo el año 2004 y la de este estudio, puede deberse a las siguientes causas:

- a. **Selección de colonias sensibles:** Debido a que las bacterias analizadas han estado conservadas durante 10 años, repicándose año a año para su mantención en refrigeración, es factible haber seleccionado sólo colonias sensibles y no aquellas que poseían el o los genes de resistencia.
- b. **Regulación de la expresión génica:** Estas cepas se han conservado en un medio de cultivo básico con ausencia de antimicrobianos, es posible que las bacterias al no estar bajo una presión selectiva del medio ambiente, regulen la expresión de su genoma, pudiendo ser capaces de no manifestar su genotipo

completo si las condiciones ambientales no son favorables, como un método de ahorro energético.

Enne *et al.*, (2006) sostienen que las bacterias podrían reducir el costo en el fitness que implica la resistencia, al silenciar los genes cuando no son requeridos, siendo este proceso reversible. Los autores sugieren que puede ser el resultado de una mutación o algún otro cambio genético de baja frecuencia, que genere una alteración cromosómica, que a su vez suprima la actividad de las secuencias promotoras de genes de resistencia provenientes de plásmidos, destacando que éstas se encontraban presentes y funcionando perfectamente. Esto fue demostrado en su estudio donde plásmidos provenientes de aislados silenciados, introducidos a otras cepas, restauraron la expresión de resistencia siempre que el gen estuviera intacto, indicando que el silenciamiento de genes es una propiedad del cromosoma del hospedero, más que del propio plásmido.

Sin embargo, existen otros casos de ausencia de expresión de genes de resistencia que se han atribuido a la carencia de secuencias promotoras efectivas que expresen el gen lo suficiente como para disminuir la susceptibilidad antimicrobiana del hospedero.

Martínez *et al.*, (2015), sostienen que existen muchos genes que codifican reguladores de fenotipos de resistencia, y que la mutación de estos genes puede causar resistencia.

La adquisición de ADN extraño por THG puede constituir una perturbación potencial para la regulación del genoma, dando como resultado un costo significativo en el fitness. Para evitar esto, se ha descrito una proteína bacteriana asociada al nucleóide, llamada “Proteína similar a Histona Estructuradora de Nucleóide” (por sus siglas en inglés H-NS), la cual funciona como un represor global de la transcripción en una amplia variedad de genes en bacterias Gram-negativas como lo es *Salmonella* spp. Los blancos de la proteína H-NS son tanto el genoma central, como los genes adquiridos por THG (Stoebel *et al.*, 2008).

- c. **Cambio en el hospedero:** Martínez *et al.*, (2015) sostienen que algunos genes, dentro de los cuales destacan aquellos que codifican para enzimas beta-lactamasas, como el gen *bla*TEM, son expresados de forma heteróloga en diferentes hospederos, y pueden silenciarse en otros hospederos específicos. Asimismo, Enne *et al.*, (2006) afirman que en los plásmidos R, la expresión de múltiples genes de resistencia no relacionados puede ser anulada o impedida por un cambio en el hospedero.
- d. **Distancia del promotor en un integrón:** También es sabido que en un reordenamiento de genes en el cassette génico de un integrón, la fuerza de su expresión disminuye a medida que los cassettes se vuelven más distantes al promotor (Gillings, 2014). Por lo tanto, si los genes de resistencia en este estudio se encontraran dentro de integrones pero muy lejanos al promotor, podría ser que estando presentes, no se expresen.

La resistencia fenotípica de las cepas analizadas fue baja, resultado muy similar a lo obtenido por Franco *et al.*, 2011, quienes observaron un 100% de sensibilidad en *Salmonella* spp. aislada de iguanas en las Islas Galápagos en Ecuador, frente a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, cirprofloxacino, cloranfenicol, colistina, florfenicol, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico, estreptomycin, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim. De una manera similar, Braun *et al.*, 2015 analizaron tres cepas de *Salmonella* spp., aisladas de los tres casos de salmonelosis por contacto con reptiles en Chile, obteniendo sensibilidad a ampicilina, cotrimoxazol, cloranfenicol y a ciprofloxacina en todas las cepas, excepto en una de ellas, que mostró susceptibilidad intermedia a esta quinolona.

Con los datos expuestos previamente, se infiere que la gran sensibilidad obtenida se puede deber a la baja presión de selección a la que están sometidos los reptiles, si se compara con animales de producción como cerdos y pollos.

A pesar de los resultados fenotípicos, se analizó la presencia de genes asociados a resistencia en todas las cepas incluyendo las sensibles, ya que como se mencionó anteriormente, la expresión fenotípica de los genes es variable por distintos motivos.

Los resultados de la detección de genes mostraron positividad únicamente al gen *bla*TEM en 21 de las 34 cepas (61,7%). La no detección de genes de resistencia a estreptomicina sin duda llamó la atención, considerando que la única resistencia fenotípica fue a este antimicrobiano (23,5%). Sin embargo, existen muchos genes que codifican para distintas enzimas que confieren resistencia a estreptomicina y en este estudio se buscaron sólo cuatro, existiendo adicionalmente otros mecanismos mediados por genes de resistencia, tales como baja penetración del antimicrobiano y alteración del sitio blanco (Wilson, 2014). Por lo tanto, es muy probable que de esos cuatro genes que se analizaron, ninguno sea el que esté generando resistencia en estas cepas, siendo muy probable que esta resistencia esté dada por otros genes, tales como *aac*, *aph* y variantes de los genes *aad* y *str* (Frye y Jackson, 2013).

La resistencia es a menudo asociada a un fitness bacteriano reducido, es por esto que si ocurre una reducción o ausencia en la presión selectiva que lleva a la adquisición de resistencia, se podría beneficiar a las bacterias susceptibles por selección natural, permitiéndoles competir con las cepas resistentes en el tiempo, llevándolas a su declinación (Andersson y Hughes, 2010). Lo anterior podría haber ocurrido en las cepas en estudio, es decir, que las cepas de *Salmonella* spp. analizadas, hayan presentado genes de resistencia en alguna ocasión, pero esta población de bacterias resistentes fue declinando al competir con la población susceptible al estar conservadas en un medio sin presión selectiva; esta competencia pudo haberse llevado a cabo al momento de repicar las cepas, ya que es ahí cuando el metabolismo bacteriano se encuentra activado, permitiendo a las células competir y dividirse.

Sin embargo, cabe destacar que existen procesos como la evolución compensatoria, donde las bacterias resistentes pueden aminorar los costos que implica la resistencia al adquirir mutaciones adicionales que restauren el fitness, y la co-selección genética (Andersson y Hughes, 2010), que permite mantener los genes de resistencia en una población bacteriana.

El hecho de que permanezca el gen *bla*TEM en las cepas, por sobre los demás genes puede deberse a que solo aquellos determinantes que confieren bajo costo o aquellos que confieren un costo que pueda ser fácilmente mejorado por mutaciones compensatorias, podrán establecerse en la población, como sostienen Martínez *et al.*, (2015). Además, existen mutaciones causantes de resistencia, que aumentan el fitness de

las cepas resistentes en ausencia de selección antimicrobiana, pero que cuando son transferidas a variantes genéticas diferentes de la bacteria, la misma mutación impone un costo en el fitness (Andersson, 2006).

Es por esto, que el gen *bla*TEM podría no causar ningún costo en el fitness, o incluso aumentarlo, lo que explicaría su permanencia dentro de las cepas analizadas. Un ejemplo de esto es el caso de ciertas mutaciones en el gen *rpsL* (resistencia a estreptomicina) en *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli* y *S. Typhimurium*, las cuales no confieren costo (Andersson, 2003).

En adición a esto, la co-selección génica permite que un gen que no está siendo seleccionado permanezca en el genoma. Este fenómeno consiste en la selección indirecta de resistencia a más de un antimicrobiano, debido a la existencia de una unión genética entre distintos genes de resistencia. Es por esto que la frecuencia de resistencia a cierto antimicrobiano podría aumentar, aun cuando este no se esté utilizando en ese momento (Anderson y Hughes, 2010). Un claro ejemplo de esto son los integrones, por lo tanto, si el gen *bla*TEM se encontrara al interior de un integrón, posiblemente se podría estar seleccionando indirectamente sin haber una presión de selección, lo que explicaría su permanencia. Sin embargo, en este estudio no podría ser el caso del gen en cuestión, por cuanto las cepas se encuentran conservadas en un medio básico sin ningún antimicrobiano. En consecuencia, la única posibilidad de que ocurra una co-selección, es que exista algún otro gen ligado al gen *bla*TEM que tenga que ver con funciones bioquímicas de la bacteria, como es el caso de los súper integrones donde se asocian genes metabólicos con genes de resistencia antimicrobiana (Rowe-Magnus *et al.*, 2001), y que este gen esté siendo seleccionado al momento del repicaje en un medio rico nutricionalmente. Cabe destacar que esto es poco factible ya que hasta la fecha no se ha publicado la existencia de esta estructura en *Salmonella* spp., aunque si en otras bacterias Gram negativas como *Vibrio* spp (Rowe-Magnus *et al.*, 2001).

La no detección de un gen también puede deberse a que simplemente la cepa en estudio no lo presente, siendo otro gen a través del mismo o diferente mecanismo, el que esté confiriendo resistencia fenotípica frente a cierto antimicrobiano. Por otro lado, puede ocurrir una pérdida o cambio del gen debido a errores en la replicación que generen mutaciones génicas o cromosómicas, tales como deleciones y sustituciones, que no sean reparadas por los sistemas de reparación celular (Hershberg, 2015). Cabe destacar que

esta última teoría es poco probable de ocurrir en las cepas analizadas, debido a que han estado en latencia por 10 años, permitiendo que se repliquen sólo una vez por año.

Es interesante señalar que no se conoce con exactitud la terapia antimicrobiana que recibieron los reptiles de los cuales se obtuvieron las cepas de *Salmonella* spp., debido a que estos provienen de distintos países donde no se conoce la presión de selección y en los Centros de Cautiverio de la RM no se obtuvo la información. Como Sobarzo obtuvo alta resistencia fenotípica a estreptomina (46,5%), se puede inferir que este antimicrobiano pudo haber sido utilizado en estos reptiles, debido a su presentación inyectable y la facilidad de administración.

Por el contrario, otra posibilidad es que la estreptomina nunca haya sido administrada, utilizándose otros aminoglicósidos tales como amikacina, gentamicina, entre otros, descritos como terapia de elección en los reptiles (Wijayanti *et al.*, 2015), donde la resistencia fenotípica obtenida el año 2004 y en el presente estudio, pueda deberse a una resistencia cruzada. Andersson y Hughes, (2010) sostienen que este fenómeno consiste en que la resistencia frente a un antimicrobiano utilizado confiere resistencia aumentada a otras drogas que posean un mecanismo de acción similar, aunque estas no se hayan utilizado nunca. Por lo tanto, aunque fenotípicamente se observe resistencia a estreptomina, esta no estaría dada por genes específicos para ella, sino que por otros genes que codifiquen para resistencia mediante un mecanismo en común con otros aminoglicósidos. Al ser estos genes distintos a los buscados, no serían detectados en el estudio.

Por otra parte, si los genes se encontraran en plásmidos, hay que considerar factores que pueden causar la pérdida de ellos en una bacteria:

- a. **Selección de colonias sensibles:** Como se mencionó anteriormente, es factible haber seleccionado sólo colonias sensibles al momento de repicar las cepas, y no aquellas que poseían plásmidos de resistencia.
- b. **Pérdida segregacional de plásmidos (curación):** La estabilidad segregacional de un plásmido depende de la partición eficiente del mismo entre las células madre e hija durante la división celular, y una falla en esto resultará en un aumento de las células libres de plásmido (Hasnain y Sherwani, 1994). Peña-Miller *et al.*, (2015),

afirman que la pérdida segregacional gradualmente reducirá la frecuencia de plásmidos en la población.

- c. Inestabilidad plasmidial por ausencia de presión de selección:** Además, si la presión selectiva es muy baja o el intervalo de tiempo entre exposición a antimicrobianos es muy lejana, los plásmidos se vuelven inestables (Peña-Miller *et al.*, 2015).
- d. Inestabilidad plasmidial por baja frecuencia de transmisión:** Peña-Miller *et al.*, 2015 sugieren que la frecuencia de transmisión de un plásmido probablemente determinará el destino del mismo, ya que en teoría, estos sólo pueden ser mantenidos en una población cuando la tasa de transferencia horizontal de genes es mayor al efecto combinado de la pérdida segregacional y la disminución del fitness asociado a su transporte.
- e. Inestabilidad plasmidial por redundancia:** Los genes codificados por plásmidos podrían teóricamente moverse al cromosoma si estuvieran bajo selección constante, llevando a una redundancia en el plásmido (Peña-Miller *et al.*, 2015).
- f. Inestabilidad plasmidial por condiciones del medio:** Factores ambientales como pH, concentraciones de glucosa y temperatura afectan la estabilidad plasmidial (Hasnain y Sherwani, 1994). Caldwell *et al.*, 1989 sostienen que bajo condiciones de escasez de nutrientes, el hospedero puede degradar el plásmido ya sea parcial o completamente y utilizarlo como una fuente de energía o de ácidos nucleicos para elevar los niveles celulares de ARN. Alternativamente, el plásmido puede ser alterado por deleciones parciales o completas, resultando en la pérdida de la capacidad para producir productos funcionales después de la resucitación.

Finalmente, la no detección de los genes sean estos cromosomales o plasmidiales, pudo ocurrir por inespecificidad de los partidores seleccionados en este estudio, como fue el caso particular del gen *aadA1*, el cual arrojó bandas inespecíficas cada vez que fue realizado. Este gen se repitió renovando la solución de trabajo de los partidores, desde la solución stock, pensando que podría deberse a una contaminación.

Posteriormente se chequeó el PCR Master MIX, el control negativo correspondiente a agua libre de nucleasas, también pensando en la posible contaminación de los mismos. Sin embargo, no presentaban contaminación y al utilizar los mismos reactivos en la búsqueda de otros genes, no se obtenía bandeo inespecífico en la cepa control.

Dado lo anterior, se volvió a repetir el PCR para este gen, esta vez disminuyendo la cantidad de ciclos del protocolo de PCR, de 30 a 26, visualizando bandas muy tenues, pero aun así existió inespecificidad. Posteriormente, se repitió aumentando el tiempo de la fase de extensión de la PCR, de 1 a 30 segundos, que es el tiempo estándar. No se obtuvieron cambios. Finalmente, se probó con diferentes temperaturas de alineamiento (55 - 65°C), utilizando un termociclador de gradiente (Labnet®), aumentando hasta en 8 grados la temperatura original y además se aumentó aún más el tiempo de alineamiento, a 45 segundos, sin obtener mejores resultados.

Debido a lo anterior, es que se propone corroborar la especificidad de los partidores utilizando un programa de bioinformática, y en lo posible, generar nuevos partidores para este gen. Adicionalmente se sugiere buscar otros genes de resistencia para estreptomicina en investigaciones futuras.

Los resultados de este estudio aportan con información sobre la presencia del gen *bla*TEM en las cepas de *Salmonella* spp. en Chile y sirve para aportar a la caracterización genómica de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles.

A pesar de la alta sensibilidad fenotípica y baja detección de genes en las cepas, este tema sigue siendo de vital importancia, debido a la popularidad que están ganando los reptiles en las familias chilenas. La introducción de estos animales a los hogares podría generar un aumento en la presión de selección antimicrobiana, ya que el estrés de sacarlos de su hábitat natural, el compartir con otros animales y la manipulación humana puede influir en su sistema inmunológico, haciéndolos más susceptibles a enfermedades y por lo tanto, al tratamiento antimicrobiano y selección de resistencia.

En Chile no existen programas oficiales de monitoreo de la resistencia antimicrobiana, como por ejemplo el NARMS en los Estados Unidos. Sería de gran utilidad que si estos se desarrollaran, se consideren a los reptiles como sujetos de

estudio, o al menos que exista una educación con respecto a la tenencia de estos animales, de forma similar a como lo hace el CDC en ese mismo país.

CONCLUSIÓN

Con los resultados de este estudio se puede concluir que en las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles no hubo detección de los genes de resistencia buscados para estreptomycin, tetraciclina y cloranfenicol. Sólo el gen *bla*TEM fue encontrado en un alto porcentaje de las cepas, las cuales fueron en su totalidad sensibles fenotípicamente a ampicilina, aunque 5 de ellas presentaron resistencia fenotípica frente a estreptomycin.

BIBLIOGRAFÍA

ABARCA, G.; HERRERA, M. 2001. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)*. 36(1-2):1-23.

ADESIJI, Y.; DEEKSHIT, V.; KARUNASAGAR, I. 2014. Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. *Food Sci. Nutr.* 2(4): 436–442.

ANDERSSON, D.; LEVIN B. 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2(5):489–493.

ANDERSSON, D. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(5):452–456.

ANDERSSON, D. 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr. Opin. Microbiol.* 9(5):461–465.

ANDERSSON, D.; HUGHES, D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8(4): 260-271.

BLAIR, J; WEBBER, M; BAYLAY, A; OGBOLU, D; PIDDOCK, L. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13(1):42-51.

BRAUN, S.; SPALLONI, W.; FERRECCIO F.; POSTIGO, J.; FERNÁNDEZ, A.; PORTE, L.; SALDIVIA, A.; WIGANT, W.; TRIANTAFILO, V. 2015. Gastroenteritis por *Salmonella* spp. en tres lactantes asociada a contacto con tortugas acuáticas. *Rev. Chilena Infectol.* 32 (3): 334-338.

BROWN-JAQUE, M; CALERO-CÁCERES, W; MUNIESA, M. 2015. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* 79:1–7.

CAFFER, M.; TERRAGNO, R. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Buenos Aires, Argentina. Ministerio de Salud, Departamento de Bacteriología. 37p.

CALDWELL B.; GRIFFITHS, C.; MOYER, C.; MORITA, R. 1989. Plasmid expression and maintenance during long-term starvation-survival of bacteria in well water. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(8): 1860-1864.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2015. Antibiotic/Antimicrobial Resistance. [en línea] <<http://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>> [consulta: 1 –12- 2015].

CHEN, C.; CHEN, W.; CHIN, S.; LAI, Y.; TUNG K.; CHIOU C.; HSU, Y.; CHANG, C. 2010. Prevalence and antimicrobial susceptibility of salmonellae isolates from reptiles in Taiwan. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22(1):44–50.

CHUANCHUEN, R.; PADUNGTOD, P. 2009. Antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 71(10): 1349-1355.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3a ed. Pennsylvania, USA. 28v.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 23a ed. Pennsylvania, USA. 33 v.

CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLOGÍA. 2008. Manual de normas de bioseguridad. [En línea] <http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2008/05/articles-28551_manual.pdf> [Consultado: 23, 03, 2015].

DOUGNAC, C; PARDO, C; MEZA, K; ARREDONDO, C; BLANK, O; ABALOS, P; VIDAL, R; FERNÁNDEZ, A; FREDES, F; RETAMAL, P. 2014. Detection of *Salmonella enterica* in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) of Chilean Patagonia: evidences of inter-species transmission. *Epidemiol. Infect.* 143(6):1187–1193.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY Y ECDC. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA J. 13:178.

ENNE, V.; DELSOL, A.; ROE, J.; BENNETT, P. 2006. Evidence of Antibiotic Resistance Gene Silencing in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 50(9):3003–3010.

FÀBREGA, A.; MADURGA, S.; GIRALT, E.; VILA, J. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb. Biotechnol. 2(1):40-61.

FRANCO, A.; HENDRIKSEN, R.; LORENZETTI, S.; ONORATI, R.; GENTILE, G.; DELL'OMO, G.; AARESTRUP, F.; BATTISTI, A. 2011. Characterization of *Salmonella* Occurring at High Prevalence in a Population of the Land Iguana *Conolophus subcristatus* in Galápagos Islands, Ecuador. PLoS ONE 6(8):1-5.

FRESNO, M.; BARRERA, V.; GORNALL, V.; LILLO, P.; PAREDES, N.; ABALOS, P.; FERNÁNDEZ, A.; RETAMAL, P. 2013. Identification of diverse *Salmonella* serotypes, virulotypes, and antimicrobial resistance phenotypes in waterfowl from Chile. Vector Borne Zoonotic Dis. 13(12):884-887.

FRYE, J.; JACKSON, C. 2013. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. Front Microbiol. 4:1-22.

GILLINGS, M. 2014. Integrons: Past, Present, and Future. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 78(2): 257–277.

HASNAIN, S.; SHERWANI, S. 1994. Some physicochemical factors affecting plasmid stability. Pakistan J. Agric. Res. 15(1): 221-232.

HERSHBERG, R. 2015. Mutation—the engine of evolution: studying mutation and its role in the evolution of bacteria. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7(9):1-13.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4th ed. 27p.

ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. 2009. Procedimiento detección de *Salmonella* en alimentos por método convencional. 26p.

ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. 2012. Instituto de Salud Pública confirma primer caso de *Salmonella* serovariedad Fluntern en el país [En línea]. <<http://www.ispch.cl/noticia/15685>>. [consulta: 1 –12- 2015].

ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE. 2014. Boletín ISP: Vigilancia de laboratorio *Salmonella* spp. 2009-2014. [en línea]. 4(10). <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletin%20Salmonella%202009-2014%20%2823-10-2014%29%20.pdf>> [consulta: 20 –04- 2015].

LAPIERRE, L.; SAN MARTÍN, B.; ARAYA-JORDÁN, C.; BORIE, C. 2010. Comparison of integron-linked antibiotic resistance genes in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine in Chile in 2005 and 2008. Can. J. Microbiol. 56(6):515-521.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Appl. Environ. Microbiol. 69(1):290-296.

MARTÍNEZ, J.; COQUE, T.; BAQUERO, F. 2015. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. Nat. Rev. Microbiol. 13(2):116-123.

MATAYOSHI, M; KITANO, T; SASAKI, T; NAKAMURA, M. 2015. Resistance phenotypes and genotypes among multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis strains isolated between 2008 and 2012 from slaughter pigs in Okinawa Prefecture, Japan. J. Vet. Med. Sci. 77(6)705-710.

MATSUURA, A.; MORALES, S.; CALLE, S.; ARA, M. 2010. Susceptibilidad a antibacterianos *in vitro* de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de carhuaz, Áncash. Rev. Inv. Vet. Perú. 21(1): 93-99.

MERMIN, J.; HUTWAGNER, L.; VUGIA, D.; SHALLOW, S.; DAILY P.; BENDER, J.; KOEHLER, J.; MARCUS, R.; ANGULO, F. 2004. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: A population-based, case-control study. Clin. Infect. Dis. 38(3):253-261.

NARMS. NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM. 2011. Human isolates final report. [en línea] <<http://www.cdc.gov/narms/pdf/2011-annual-report-narms-508c.pdf>> [consulta: 1 –12- 2015].

OIE. WORLD ORGANIZATION OF ANIMAL HEALTH. 2015. Ficha FAO/OIE/OMS de la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos [en línea] <<http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/onehealth-es/>> [consulta: 1 –12- 2015].

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2014. Antimicrobial resistance global report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. [en línea]. <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. [consulta: 20 –04- 2015].

PACHÓN, D.; PULIDO, A.; MORENO, C. 2011. Aislamiento y serotipificación de *Salmonella* sp. en estanques con *Crocodylus intermedius* y testudines cautivos en Villavicencio – Colombia. Rev. MVZ Córdoba. 16(2):2564-2575.

PASMANS, F.; MARTEL, A.; BOYEN, F.; VANDEKERCHOVE, D.; WYBO, I.; VAN IMMERSEEL, F.; HEYNDRIKX, M.; COLLARD, J.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. 2005. Characterization of *Salmonella* isolates from captive lizards. Vet. Microbiol. 110(3-4):285-291.

PEÑA-MILLER, R.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MACLEAN, C.; SAN MILLAN, A. 2015. Evaluating the effect of horizontal transmission on the stability of plasmids under different selection regimes. Mob. Genet. Elements. 5(3):1-5.

ROWE-MAGNUS, D.; GUEROUT, A.; PLONCARD, P.; DYCHINCO, B.; DAVIES, J.; MAZEL, D. 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrans provides an ancestry for multiresistant integrans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:652-657.

SKYBERG, J.; LOGUE, C.; NOLAN, L. 2006. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Dis.* 50(1):77-81.

STOEBEL, D.; FREE, A.; DORMAN, C. 2008. Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology.*154: 2533–2545.

SOBARZO, G. 2004. Detección y sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp de reptiles y aves exóticas en cautiverio. Memoria Título Médico Veterinario. Departamento de Medicina Preventiva Animal. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 48 p.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.; ANGULO, F.; TAUXE, R.,; WIDDOWSON, M.; ROY, S.; JONES, J.; GRIFFIN, P. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg. Infec. Dis.*17(1):7-15.

TOLEDO, F. 2009. Detección de *Salmonella* spp. en tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) en la ciudad de Valdivia. Memoria Título Médico Veterinario. Instituto de medicina preventiva veterinaria. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile. Fac. Cs. Veterinarias. 36p.

TORO, C.; FARFÁN, M.; CONTRERAS, I.; FLORES, O.; NAVARRO, N.; MORA, G.; PRADO, V. 2005. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiol. Infect.* 133(1):81–86.

WIJAYANTI, A.; SATRIA, D.; WAHYUNI, A. 2015. The routes of administration of amikacin as consideration in reptile therapy. *Procedia Chemistry* 14:22-26.

WILSON, D. 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*12(1): 35–48.

PLANIFICACIÓN

Tabla de actividades necesarias para realizar el estudio, estimado en una etapa de seis meses, representando cada casilla un periodo de dos semanas.

Periodo Actividad	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Inducción*												
Pureza e identificación fenotípica de cepas												
Identificación genómica de género												
Antibiogramas												
PCR genes de resistencia antimicrobiana (6)												
Análisis de resultados y preparación de avance												
Primer avance de resultados												
PCR genes de resistencia antimicrobiana (6)												
Análisis de resultados												
Preparación de memoria, entrega y presentación final												

***Inducción:** bioseguridad, contaminación, preparación de medios, siembra en medio sólido y líquido, tinciones, análisis de baterías bioquímicas, aglutinación, PCR, electroforesis, y técnica de KirbyBauer estandarizada.

ANEXO 1

Tabla N° 1: Reptiles en cautiverio de la Región Metropolitana positivos a *Salmonella spp* según especie animal (Sobarzo, 2004).

ESPECIE ANIMAL	NÚMERO DE ANIMALES	POSITIVOS
Orden Testudines		
<i>Trachemys scripta</i>	7	1
<i>Geochelone chilensis</i>	4	1
<i>Geochelone denticulata</i>	3	2
<i>Chelus fimbriatus</i>	1	0
<i>Platemys platicephala</i>	2	2
<i>Chelydra serpentina</i>	5	3
Total (%)	22 (100%)	9 (40,9%)
Orden Squamata		
Sub Orden Sauria		
<i>Tiliqua scincoides</i>	1	0
<i>Varanus exanthematicus</i>	2	2
<i>Pogona vitticeps</i>	1	1
<i>Tupinambis merinae</i>	4	4
<i>Tupinambis rufescens</i>	6	6
<i>Tupinambis teguixin</i>	2	1
<i>Iguana iguana</i>	22	18
<i>Callopistes palluma</i>	3	0
<i>Callopistes spp.</i>	2	0
Total (%)	43 (100%)	32 (74,4%)
Sub Orden Ophidia		
<i>Philodryas baroni</i>	5	3
<i>Philodryas chamisoni</i>	2	0
<i>Philodryas chilena</i>	1	0
<i>Phyton molurus</i>	1	1
<i>Philodryas trilineatus</i>	3	0
<i>Phyton regius</i>	2	2
<i>Boa occidentalis</i>	3	2
<i>Boa constrictor</i>	5	5
<i>Epicrates Cenchria</i>	1	0
<i>Hydrodynastes gigas</i>	3	3
<i>Elaphe obsoleta</i>	2	0
<i>Lampropeltis getula</i>	2	1
Total (%)	30 (100%)	17 (54,8%)
Orden Crocodylia		
<i>Caiman crocodylus</i>	1	0
Total (%)	1 (100%)	0 (0%)
TOTAL REPTILES	96 (100%)	58 (60,4%)

ANEXO 2

Tabla N° 2: Resultados de cada cepa, para aglutinación y batería bioquímica.

N° de Cepa	Aglutinación	Indol	Kligler	Fenilalanina	Citrato
3	+	-	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
5	-	-	H ₂ S, G+	-	+
6	-	-	H ₂ S, L-, G+ CO ₂	-	+
9	+	-	H ₂ S, CO ₂	-	+
10	-	-	H ₂ S, G+	-	+
11	-	-	H ₂ S, G+, L-	-	+
12	-	+	H ₂ S, G+	-	+
13	-	+	H ₂ S, G+	-	+
14	-	-	H ₂ S	-	+
15	+	-	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
16	+	+	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	-
18	+	+	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
19	+	-	H ₂ S, CO ₂	-	+
20	-	-	H ₂ S, G+	-	+
21	-	-	H ₂ S, G+, L-	-	+
22	-	-	H ₂ S, G+, L-	-	-
23	+	-	H ₂ S, G+, L+, CO ₂	-	+
24	+	-	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
26	+	-	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
29		-	H ₂ S, G+, L-	-	+
30	-	-	H ₂ S, G+ CO ₂ , L-	-	+
31	-	-	H ₂ S, G+, L-	-	+
33	-	-	H ₂ S, G+, L-	-	+

35	-	-	H ₂ S, G+	-	+
36	-	-	H ₂ S	-	+
37	-	-	H ₂ S, G+, L-	-	+
38	+	-	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
39	+	-	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
40	-	-	H ₂ S, G+, L-	-	+
42	+	-	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
43	+	-	H ₂ S, CO ₂	-	+
46	+	-	H ₂ S, G+, L-, CO ₂	-	+
47	-	-	H ₂ S, G+ CO ₂	-	+
48	-	-	H ₂ S	-	+

H₂S: ácido sulfhídrico, G+: fermentación de glucosa, L -: no fermentación de lactosa, CO₂: presencia de gas.

ANEXO 3

Tabla N°3: Partidores específicos para cada gen y tamaño de su amplificado.

Gen	Secuencia de ADN (5' a 3')	Temp. Alineamiento (°C)	Tamaño amplicón (bp)	Referencia
<i>invA</i>	F: CTGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCTCTATT R: AGTTTCTCCCCCTTTCATGCGTTACCC	66,5	1.070	Skyberg <i>et al.</i> , 2006
<i>blaTEM</i>	F:ATCAGTTGGGTGCACGAGTG R:ACGCTCACCGGCTCCAGA	57	608	Chuanchuen y Padungtod, 2009
<i>blaPSE-1</i>	F:GCAAGTAGGGCAGGCAATCA R:GAGCTAGATAGATGCTCACAA	57	422	Chuanchuen y Padungtod, 2009
<i>blaOXA</i>	F:ACTGTGCGCATCTCCATTATTTGA R:ATCGCATTTTTCTTGGCTTTTAT	52	713	Toro <i>et al.</i> , 2005
<i>strA</i>	F: TGGCAGGAGGAACAGGAGG R: AGGTCGATCAGACCCGTGC	57	405	Chuanchuen y Padungtod, 2009
<i>strB</i>	F: GCGGACACCTTTTCCAGCCT R: TCCGCCATCTGTGCAATGCG	57	621	Chuanchuen y Padungtod, 2009
<i>aadA1</i>	F: CTCCGCAGTGGATGGCGG R: GATCTGCGCGCGAGGCCA	57	631	Chuanchuen y Padungtod, 2009
<i>aadA2</i>	F: CATTGAGCGCCATCTGGAAT R: ACATTTGCTCATCGCCGGC	57	500	Chuanchuen y Padungtod, 2009
<i>tet(A)</i>	F:GCTGTGCGGATCGTTTTCGG R:CATTCCGAGCATGAGTGCC	57	658	Chuanchuen y Padungtod, 2009
<i>tet(B)</i>	F:CTGTCGCGGCATCGGTCAT R:CAGGTAAAGCGATCCCACC	57	615	Chuanchuen y Padungtod, 2009
<i>tet(C)</i>	F:CTTGAGAGCCTTCAACCCAG R:ATGGTCGTCATCTACCTGCC	55	418	Adesiji <i>et al.</i> , 2014
<i>cmlA</i>	F:TGGACCGCTATCGGACCG R:CGCAAGACACTTGGGCTGC	57	641	Chuanchuen y Padungtod, 2009

*F: forward (hacia adelante); R: reverse (inversa).

Tabla N° 4: Protocolos de PCR para cada gen.

Gen	Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Extensión
<i>blaTEM</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min
<i>blaPSE-1</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min
<i>blaOXA</i>	92°C por 1 min	30	92°C por 1 min	52 °C por 30 s	72°C por 1 min 72°C por 10 min
<i>strA</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min
<i>strB</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min
<i>aadA1</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min
<i>aadA2</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min
<i>tet(A)</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min
<i>tet(B)</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min
<i>tet(C)</i>	95°C por 5 min	35	94°C por 30 s	55°C por 30 s	72°C por 30 s 72°C por 10 min
<i>cmlA</i>	94°C por 5 min	30	94°C por 45 s	57°C por 45 s	72°C por 1 s 72°C por 5 min