Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

Determinación de los perfiles de susceptibilidad a antibióticos y genes *bla*$_{CMY-2}$ y *bla*$_{CTX-M}$ en bacterias del género *Salmonella* aisladas de tres matrices de la cadena de producción avícola de Costa Rica

Modalidad: Tesis de Grado

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria

Raquel Hernández Rojas

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2022

TRIBUNAL EXAMINADOR

Laura Sofía Bouza Mora, MSc.

Vicedecana Facultad de Ciencias de la Salud

LAURA SOFIA BOUZA MORA (FIRMA)

Firmado digitalmente por LAURA SOFIA BOUZA MORA (FIRMA)
Fecha: 2022.05.10 13:07:03 -06'00'

Julia Rodríguez Barahona, PhD.

Subdirectora Escuela de Medicina Veterinaria

_____

Lohendy Muñoz Vargas, PhD.

Tutora

LOHENDY MAYELA MUÑOZ VARGAS (FIRMA)

Digitally signed by LOHENDY MAYELA MUÑOZ VARGAS (FIRMA)
Date: 2022.05.10 16:12:08 -06'00'

Andrea Molina Alvarado, PhD.

Lectora

_____

Rebeca Zamora Sanabria, MSc.

Lectora

_____

Fecha: _____

DEDICATORIA

A mi madre Cecilia por su apoyo incondicional en cada decisión que he tomado a lo largo de mi vida, gracias por enseñarme a fijarme metas claras y a trabajar fuerte hasta lograrlas. A mi abuelo Roberto por siempre creer en mí e impulsarme a seguir mis sueños hasta el último día de su vida. A Luis por todo su apoyo a lo largo de estos años de carrera universitaria. A mi prima Joha y mi tía Merce por apoyarme desde el primer día que decidí estudiar Medicina Veterinaria. A mis mascotas Oggy, Miah y Titi, por recordarme con su amor incondicional la razón por la que desde niña quise ser Médico Veterinario.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Lohendy Muñoz por sus consejos, motivación y apoyo como Profesora y Tutora. A la Doctora Andrea Molina por su paciencia y dedicación para instruirme en el laboratorio. A la Doctora Rebeca Zamora por sus recomendaciones, sin ellas esta investigación no habría sido posible.

Al personal del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Nutrición Animal de la UCR por recibirme en esta agradable institución. Al personal del Laboratorio de Bacteriología de la UNA, especialmente al Doctor Elías Barquero por sus consejos a lo largo de este trabajo de investigación. Al personal del Laboratorio de Patología aviar de la UNA, en especial a Dioney por su apoyo, consejos y motivación.

A los que fueron mis compañeros y amigos a lo largo de todos estos años de carrera universitaria Dani, Andrés, Henry, Kari, Meli, Andre, Wilson y Jess, siempre ocuparán un lugar especial en mi corazón. A mis compañeros de investigación Ernesto y Laura, gracias por toda su ayuda.

A la Doctora Faride y el Doctor Gustavo por mostrarme el maravilloso mundo de la investigación. A la Doctora Rocío y la Doctora Fiorella por enseñarme a disfrutar el trabajo en clínica, incluso en los días no tan buenos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR ii
DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTOS iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS v
ÍNDICE DE CUADROS viii
ÍNDICE DE FIGURAS x
LISTA DE ABREVIATURAS xi
RESUMEN xiv
ABSTRACT xvi
1 INTRODUCCIÓN 1
1.1 Antecedentes 1
1.1.1 *Salmonella*: Generalidades 1
1.1.2 *Salmonella* en aves 3
1.1.3 *Salmonella* en pollo para consumo humano: ETAs 7
1.1.4 Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* en pollo para consumo humano 11
1.2 Justificación 16
1.3 Objetivos 19
1.3.1 Objetivo General 19
1.3.2 Objetivos Específicos 19
2 MATERIALES Y MÉTODOS 20
2.1 Procedencia de los aislamientos 20
2.2 Procesamiento de las muestras 21
2.2.1 Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer 21
2.2.2 Determinación de la presencia del gen bla_{CMY-2} 22
2.3 Criterios de interpretación 25
2.3.1 Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer 25

2.3.2 Procedimientos llevados a cabo como parte del proyecto inscrito bajo el código B-9252 de la UCR, realizado por el Centro de Investigación en Nutrición Animal de forma paralela a la presente investigación 27

2.4 Análisis estadístico 29

2.4.1 Definición de variables 30

3 RESULTADOS 31

3.1 Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer 31

3.2 Determinación de la presencia del gen *bla*$_{CMY-2}$ por PCR convencional 39

3.3 Resultados obtenidos como parte del proyecto inscrito bajo el código B-9252 de la UCR, realizado de forma paralela a la presente investigación 40

3.3.1 Comparación de resultados fenotípicos y genotípicos 40

3.3.2 Determinación de los serovares de *Salmonella enterica* por secuenciación de genoma completo y análisis con SISTR versión 1.1.1 41

3.4 Determinación de la presencia de los genes *bla*$_{CMY-2}$ y *bla*$_{CTX-M}$ y otros genes de resistencia por secuenciación de genoma completo y análisis con ResFinder versión 4.0 43

4 DISCUSIÓN 46

4.1 Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer 46

4.1.1 Aminoglucósidos 46

4.1.2 Betalactámicos 47

4.1.3 Fenicoles 51

4.1.4 Macrólidos 53

4.1.5 Quinolonas 54

4.1.6 Fluoroquinolonas 55

4.1.7 Nitrofuranos 57

4.1.8 Antagonistas del folato 58

4.1.9 Alimento para aves 60

4.1.10 Perfiles fenotípicos de resistencia 63

4.2 Determinación de la presencia del gen *bla*$_{CMY-2}$ por PCR convencional 65

4.3 Comparación de resultados fenotípicos y genotípicos 66

4.4 Determinación de los serovares de *Salmonella enterica* por secuenciación de genoma completo y análisis con SISTR versión 1.1.1 67

4.5 Determinación de la presencia de los genes bla_{CMY-2} y bla_{CTX-M} y otros genes de resistencia por secuenciación de genoma completo y análisis con ResFinder versión 4.0 69

5 CONCLUSIONES 73

6 RECOMENDACIONES.....74

7 FUENTE DE FINANCIAMIENTO.....76

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la detección de genes de resistencia de BLEEs sintetizados con base en la secuencia de nucleótidos de NCBI, 2021……25

Cuadro 2. Puntos de corte para Enterobacterias basados en el CLSI, 2022…….…….…26

Cuadro 3. Distribución de resistencia (R, %) en 101 aislamientos recuperados de planta de cosecha y punto de venta, según el método de Kirby-Bauer….……..……..32

Cuadro 4. Distribución de aislamientos (n, %) de *Salmonella enterica* resistentes a los antibióticos, utilizando el método de Kirby-Bauer, según su origen en la cadena de producción avícola de Costa Rica……..…..34

Cuadro 5. Perfiles de resistencia de aislamientos de *Salmonella enterica* por familia de antibiótico, según su origen dentro de la cadena de producción avícola de Costa Rica…….……..36

Cuadro 6. Comparación entre la caracterización fenotípica y genotípica de 71 aislamientos de *Salmonella enterica* recuperados en tres puntos de la cadena avícola de Costa Rica……..40

Cuadro 7. Distribución de los perfiles de resistencia (n, %) utilizando el método de Kirby-Bauer, en *Salmonella enterica* por serovar, según su origen, en un total de 71 aislamientos……42

Cuadro 8. Distribución porcentual de genes de resistencia encontrados con el software ResFinder versión 4.0, en *Salmonella enterica*, según serovar, en un total de 71 aislamientos……45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resistencia a Betalactámicos en aislamientos de *Salmonella enterica*, según grupo y origen……38

Figura 2. Visualización de PCR para determinación de la presencia del gen *bla*$_{CMY-2}$ por medio de electroforesis capilar, utilizando el instrumento QIAxcel Advanced…….39

Figura 3. Frecuencia en la presentación de genes de resistencia por familia de antibióticos detectados en aislamientos de Salmonella enterica con el software ResFinder versión 4.0……..……..44

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Aminoglucósidos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMC: Amoxicilina Clavulanato

AMK: Amikacina

AMP: Ampicilina

ATB: Antibiótico

ATM: Aztreonam

AVAD: Años de Vida Ajustados por Discapacidad

a_w: Actividad de agua

AZT: Azitromicina

B: Betalactámicos

BLEEs: Betalactamasas de Espectro Extendido

CAT: Cloranfenicol Acetil-Transferasa

CAZ: Ceftazidima

CHL: Cloranfenicol

CINA: Centro de Investigación en Nutrición Animal

CIP: Ciprofloxacina

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CNRB: Centro Nacional de Referencia de Bacteriología

CTX: Cefotaxima

dNTPs: Deoxynucleotide Triphosphates

ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (del inglés: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EMV-UNA: Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional

ETA: Enfermedades de Transmisión Alimentaria

ETP: Ertapenem

F: Fluoroquinolonas

FEP: Cefepima

FI: Antagonistas del Folato

FOCAES: Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles

FOX: Cefoxitina

GEN: Gentamicina

GHP: Buenas Prácticas de Higiene (del inglés: Good Hygiene Practices)

HACCP: Buenas Prácticas y Análisis de Riesgos y puntos Críticos de Control (del inglés: Hazard Analysis and Critical Control Points)

IC: Intervalo de confianza

IMP: Imipenem

KZ: Cefazolina

LANASEVE: Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios

M: Macrólidos

MEM: Meropenem

mL: Mililitros

MLST: Multilocus Sequence Typing

mm: Milímetros

N: Nitrofuranos

NAL: Ácido Nalidíxico

NIT: Nitrofurantoina

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

P: Fenicoles

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)

pb: Pares de Bases

pH: Potencial de Hidrógeno

Q: Quinolonas

R: Resistente

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

ST: Sequence type

SISTR: *Salmonella* In Silico Typing Resource

SPIs: Islas de patogenicidad de *Salmonella* (del inglés: *Salmonella* Pathogenicity Islands)

SXT: Trimetoprima Sulfametoxazol

TZP: Piperacilina Tazobactam

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UNA: Universidad Nacional

USDA: United States Department of Agriculture

WGS: Whole Genome Sequencing

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la susceptibilidad a 20 antibióticos y la presencia de genes de resistencia a betalactámicos, específicamente *bla*$_{CMY-2}$ y *bla*$_{CTX-M}$ en aislamientos de *Salmonella enterica* recuperados de pollo de engorde en tres matrices dentro de la cadena avícola de Costa Rica. Para lograrlo se recurrió a la determinación de los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer y técnicas de caracterización molecular.

Se encontró resistencia en todas las familias de antibióticos en estudio, siendo un 91.3% de las bacterias multirresistentes. Aislamientos con perfil de resistencia a los betalactámicos evidenciado por el método de Kirby-Bauer fueron seleccionados para determinar la presencia de los genes mediante la técnica de PCR.

En un estudio paralelo se efectuó secuenciación de genoma completo a 71 de los aislamientos de la presente investigación, la información generada fue utilizada para la detección de genes de resistencia de interés en salud pública mediante ResFinder versión 4.0. El gen *bla*$_{CTX-M-65}$, fue encontrado en un 67.6% y el gen *bla*$_{CMY-2}$ no fue detectado, por lo que se recurrió a la validación de estos resultados por medio de la técnica de PCR convencional, confirmándose la ausencia del gen *bla*$_{CMY-2}$ en los aislamientos con perfil de resistencia a los betalactámicos. Además, se encontraron genes de resistencia a los aminoglucósidos, al cloranfenicol, a la fosfomicina, a las sulfonamidas y a las tetraciclinas.

Se establecieron los serovares de *Salmonella* por medio del software The Salmonella In Silico Typing Resource (SISTR) versión 1.1.1, obteniendo un 2.8% de prevalencia del serovar *S.* Kentucky, 2.8% de *S.* Anatum y un 94.4% del serovar

S. Infantis, siendo este último reportado como uno de los principales serovares aislados de infecciones por *Salmonella* en seres humanos de Costa Rica.

Dados los resultados obtenidos, se recomienda indagar sobre las vías por medio de las cuales las bacterias adquieren la resistencia con el fin de determinar las medidas de intervención más efectivas. Asimismo, reforzar los sistemas de Buenas Prácticas de Higiene, así como Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control a nivel de planta de cosecha, evitar la contaminación en punto de venta y educar al consumidor final sobre la correcta preparación de la carne de pollo siguiendo estrictas normas de manipulación de alimentos, con el fin de prevenir las infecciones en seres humanos y en animales.

Palabras clave: *Salmonella enterica*, bla_{CMY-2}, bla_{CTX-M}, pollos de engorde, secuenciación de genoma completo, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

The research objective was to determine the susceptibility to twenty antibiotics and the presence of beta-lactam resistance genes, specifically *bla*$_{CMY-2}$ and *bla*$_{CTX-M}$ in isolates of *Salmonella enterica* recovered from broiler chickens in three areas in the poultry chain in Costa Rica. The Kirby-Bauer method and molecular characterization techniques were used to achieve the determination of the antibiotic's susceptibility.

Resistance was found in all families of antibiotics within the study, with 91.3% of isolates resistant to three or more families of antibiotics, classifying them as multiresistant. Isolates with a resistance profile to beta-lactams, shown by the Kirby-Bauer method, were selected to determine the presence of genes with the PCR technique.

Complete genome sequencing in a parallel study of this investigation was used for the detection of resistance with interest in public health by means of ResFinder version 4.0. The *bla*$_{CTX-M-65}$ gene was found in 67.6% of the isolates, while the *bla*$_{CMY-2}$ gene was not detected. These results were validated with the conventional PCR technique, whereas the absence of the *bla*$_{CMY-2}$ gene was confirmed in isolates with a beta-lactam resistance profile. Genes resistant to aminoglycosides, chloramphenicol, fosfomycin, sulfonamides and tetracyclines were also detected. The *Salmonella* serovars were determined using the software The Salmonella In Silico Typing Resource (SISTR) version 1.1.1 software, obtaining a 2.8% prevalence of the serovar *S*. Kentucky, 2.8% of *S*. Anatum and 94.4% of the serovar *S*. Infantis, the latter being reported as one of the main serovars isolated from *Salmonella* infections in humans from Costa Rica.

Based on the resistance statistics found within this study, further investigation is recommended to determine how the bacteria acquires resistance to implement the most effective intervention measures. To prevent infections in both humans and animals, strict protocols must be reinforced and implemented. This includes following the systems of Good Hygiene Practices (GHP) and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) in slaughterhouses, avoid contamination at sales, and educate the final consumer on the correct preparation of poultry meat, following strict food handling standards.

Keywords: *Salmonella enterica*, *bla*$_{CMY-2}$, *bla*$_{CTX-M}$, poultry, WGS, antimicrobial resistance.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Salmonella*: Generalidades

Salmonella spp. es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, que cuenta con pared celular, morfología bacilar y un metabolismo de anaerobiosis facultativo. A pesar de que la mayoría de las especies son motiles mediante sus flagelos perítricos, existen dos variantes no flageladas: *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovares Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum) y Pullorum (*Salmonella* Pullorum) (Kwon et al. 2000; D'Aoust y Maurer 2007; Xiong et al. 2018).

Una célula bacteriana de *Salmonella* puede medir aproximadamente entre 0.5 µm y 1.5 µm de ancho por 2-5 µm de largo (Andino y Hanning 2015). Este género no tiene la capacidad de formar esporas, es catalasa positiva, es decir, descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, que a nivel macroscópico se evidencia por la formación de burbujas, además es oxidasa negativa, que corresponde a la ausencia del citocromo C oxidasa (Fernández et al. 2010; Ryan et al. 2017).

Su ubicuidad radica en la versatilidad de condiciones para su crecimiento. Así, la temperatura óptima para el crecimiento de *Salmonella* es de 35°C a 37°C, pero cuenta con la capacidad de formar cadenas filamentosas que le permiten crecer en temperaturas extremas, desde los 4°C hasta los 44°C (Bhunia 2008). En medios no selectivos, la temperatura de incubación puede ir entre 34°C y 38°C, ya que no suele ser tan crítica como en medios selectivos (Mooijman 2018). El pH óptimo es de 6.5 a

7.5, sin embargo, se ha reportado el crecimiento desde los 3.8 hasta los 9.5 (Ryan et al. 2017). Su a_w óptimo corresponde a 0.99, con un rango que va desde los 0.94 hasta >0.99 (King et al. 2011). No obstante, estudios realizados en alimento para aves, indican que el a_w al que ocurre el crecimiento de *Salmonella* varía dependiendo de la cepa bacteriana (Andino et al. 2014).

Esta bacteria logra mantenerse en alimentos ricos en proteínas y lípidos, mientras que las concentraciones altas en sal inhiben su crecimiento, además no es tolerante a las altas temperaturas, por lo que es posible inactivarla por medio de una adecuada cocción de los alimentos (Buncic 2006).

Actualmente se han reportado dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. El primer aislamiento de *Salmonella bongori* se obtuvo de una lagartija en la ciudad de Bongor, África, de donde se origina su nombre; esta especie bacteriana se caracteriza por afectar principalmente a los animales poiquilotermos, por lo que no es común el reporte de casos en humanos (Tortora et al. 2007). *Salmonella enterica,* por su parte, cuenta con la capacidad de afectar a los animales homeotermos, como los seres humanos, de manera que adquiere mayor relevancia para la salud pública (Mansfield y Fox 2019). La enterocolitis provocada por *Salmonella enterica* corresponde a una de las intoxicaciones alimentarias más comunes en el mundo, debido a que se puede encontrar en una gran variedad de alimentos (MedlinePlus 2020).

Salmonella enterica a su vez se subdivide en seis subespecies, basado en características genómicas y bioquímicas: *enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae* e in*dica* (Friend y Franson 1999; Andino y Haning 2015). Además, basados

en lipopolisacáridos, proteínas flagelares y antígenos de cápsula, existen más de 2541 serovares de *Salmonella enterica* (Brenner et al. 2000; D'Aoust y Maurer 2007).

1.1.2 *Salmonella* en aves

Tanto en seres humanos como en animales, el término utilizado para referirse a las infecciones por bacterias del género *Salmonella* se conoce como salmonelosis (Forsythe y Hayes 1999). Las aves de corral son huéspedes naturales para *Salmonella* Pullorum, que produce en ellas pullorosis y *Salmonella* Gallinarum, que les provoca la enfermedad de Klein o tifosis aviar. También es común el aislamiento en aves de corral de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, que les causa la enfermedad conocida como paratifosis aviar y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, ambos considerados patógenos para el ser humano (Wray et al. 1999; Terzolo 2004).

La transmisión de *Salmonella* en las aves de corral puede ocurrir de manera horizontal por la ruta fecal oral, por consumo de heces o alimentos contaminados e incluso iatrogénicamente por medio de equipos utilizados por el personal de la granja (SAG 2016a). La transmisión de forma vertical ocurre por la ruta transovárica, debido a que las bacterias de *Salmonella* migran desde el oviducto hasta el huevo, previo a la formación de la cáscara, de manera que las aves nacen infectadas; no obstante, el huevo se puede infectar horizontalmente después de la eclosión a través de la cáscara, debido a contaminación fecal, la transmisión vertical es la más difícil de regular, debido a que no se corrige con buenas prácticas de manejo, sino eliminando a los animales infectados (FAO 2005) y se previene con protocolos de vacunación y buenas prácticas de bioseguridad (SENASA 2020a). Además, la bacteria puede ingresar a las granjas

por medio de animales silvestres como los roedores o incluso otras aves de vida libre (Hafez 2001; Lutful 2010). En este particular, las aves silvestres han sido consideradas diseminadores de agentes debido sus características migratorias, propiciando que las enfermedades pasen de un país a otro en poco tiempo (Rey et al. 2016). Uno de los principales aislamientos de *Salmonella* en aves silvestres corresponde a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium, el cual es patógeno para los seres humanos (Lawson et al. 2014).

La pullorosis suele presentarse como una enfermedad sistémica aguda que afecta principalmente a las aves de corral jóvenes, mientras que la tifosis aviar corresponde a una enfermedad septicémica, tanto aguda como crónica, que se presenta en aves de corral adultas, sin evidencia de zoonosis reportada en ninguno de los dos casos. La bacteria ingresa por medio del tracto gastrointestinal, posteriormente invade a los macrófagos, los mismos se dirigen al hígado y el bazo donde se replica el agente, de esta manera la enfermedad se torna sistémica. Dependiendo de la acción del sistema inmunológico la enfermedad puede progresar hasta causar la muerte o permanecer en el animal de manera asintomática (Henderson et al. 1999; Shivaprasad y Barrow 2008; Chappell et al. 2009; Terzolo 2009).

La enfermedad provocada por la infección de *Salmonella* Pullorum también es conocida como diarrea blanca bacilar, en aves adultas se torna asintomática, mientras que en aves jóvenes presenta un incremento en la mortalidad en los días siete a diez posteriores a la eclosión. La sintomatología puede incluir depresión, somnolencia y retardo del crecimiento; a nivel de necropsia se evidencian nódulos de color blanco o gris en el corazón, pulmones, hígado, paredes de la molleja, intestinos y peritoneo

(Dinev 2010). La tasa de morbilidad y mortalidad dependerá del nivel de nutrición, manejo, grado de exposición y presencia de enfermedades concomitantes (Shivaprasad y Barrow 2008).

La tifosis aviar no representa un riesgo para la salud pública, dado que sólo afecta a las aves, principalmente adultas. En la presentación aguda es común observar postración, plumas erizadas y crestas pálidas, pero lo que más afecta al sistema de producción es que las aves muestran una disminución en la ganancia de peso y la postura de huevos (SAG 2016b). Cuando ocurre la presentación crónica, durante la necropsia se evidencia afección de los ovarios, los cuales presentan cambios inflamatorios y degenerativos (Dinev 2010).

La paratifosis aviar, causada por serovares móviles, como *Salmonella* Enteritidis, de la cual las aves no son huéspedes naturales, es una de las enfermedades aviares de mayor relevancia en salud pública, por ser de carácter zoonótico (Terzolo 2004). Puede tener una presentación crónica o aguda en aves, con una alta morbilidad y un aumento de la mortalidad principalmente en las primeras dos semanas post eclosión (Dinev 2010).

El protocolo de vigilancia de *Salmonella* en pollos de engorde de Costa Rica se enfoca en *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum y *Salmonella* Enteritidis (SENASA 2020a). Además, se cuenta con un protocolo de vigilancia de *Salmonella* en aves reproductoras dirigido a estos mismos tres agentes, con el fin de evitar la transmisión vertical a los pollos de engorde (SENASA 2020b).

Como parte del protocolo de vigilancia en pollos de engorde se toman muestras de arrastre en la cama de la galera, muestras fecales, meconio, combinación de hígado

y bazo, combinación de ciego y tonsilas cecales, médula ósea, alimentos y enjuague del pollo en la planta de procesamiento. El laboratorio oficial para el procesamiento de las muestras en Costa Rica es el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE), además, se cuenta con una red de laboratorios debidamente autorizados por el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). Una vez en el laboratorio se realizan pruebas de tamizaje como la prueba de aglutinación en placa, microaglutinación o Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA, del inglés: Enzyme-linked immunosorbent assay); como pruebas confirmatorias se utiliza el cultivo bacteriano y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés: Polymerase chain reaction) en tiempo real (SAG 2016a y SENASA 2020a).

Algunos antibióticos que se han utilizado en aves para el tratamiento de salmonelosis son los pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos como la gentamicina, quinolonas como la ofloxacina, fenicoles como el cloranfenicol, cuyo uso está prohibido en Costa Rica y muchos países alrededor del mundo actualmente, y en menor cantidad las sulfonamidas debido a su toxicidad renal en aves (Melo et al. 2007).

El tratamiento que se instaura una vez confirmada la enfermedad por *Salmonella* en aves no debe de centrarse en el uso de antibióticos, debido a que estos suelen ocultar la enfermedad durante los muestreos, de manera que la bacteria no se detecta en las heces, pero puede alojarse en el ave a la espera de condiciones donde la inmunidad se vea comprometida. Además, se afecta la microbiota intestinal del ave y la puede exponer a la colonización por *Salmonella.* En algunos casos se puede recurrir a un antibiograma para tratar aves de alto valor genético (Contreras 2010 y OIE 2021).

El uso de acidificantes ha demostrado ser eficaz en la reducción de la tasa de crecimiento de *Salmonella* en las aves, lo que se puede utilizar tanto con fines preventivos como de tratamiento. Además, el uso de probióticos ayuda a que las aves alcancen una adecuada población de microorganismos benéficos en su intestino a tempranas edades, previniendo así la infección por *Salmonella* (Contreras 2010). Por su parte la implementación de protocolos de vacunación, programas de Buenas Prácticas y Análisis de Riesgos y puntos Críticos de Control (HACCP, del inglés: Hazard Analysis and Critical Control Points) que velen por el mantenimiento de la bioseguridad en las granjas resultan fundamentales en la prevención y control de la salmonelosis aviar (SAG 2016, OIE 2021).

1.1.3 *Salmonella* en pollo para consumo humano: ETAs

Las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETAs) son provocadas por la ingestión de agua o comida contaminada, ya sea con agentes químicos o microorganismos. Debido a su múltiple causalidad existen diferentes manifestaciones que van más allá de la sintomatología gastrointestinal, incluyendo afecciones del sistema nervioso, reproductor e inmunológico (OMS 2020a). A pesar de que toda la población mundial se puede ver expuesta a las ETAs, en algunos grupos etarios las manifestaciones de la enfermedad pueden ser severas e incluso mortales, como lo son niños, adultos mayores y personas con un sistema inmunológico debilitado (Adams et al. 2016).

Salmonella enterica se puede clasificar en tifoidal y no tifoidal. En el caso de *Salmonella enterica* tifoidal el reservorio es exclusivamente humano, causada por los

serovares Typhi y Paratyphi, que se manifiesta clínicamente como una enfermedad invasiva, provocando fiebre y potencialmente la muerte (Quirós 2016; OMS 2018a). *Salmonella enterica* no tifoidal tiene como reservorio a otros animales y como agentes causales están los serovares Typhimurium, Enteritidis, Mbandaka, Heidelberg, entre otras (Quirós 2016; Ortiz et al. 2021). En cuanto a la manifestación clínica suele ser no invasiva en seres humanos, causando principalmente afección a nivel entérico, pero se puede agravar en pacientes inmunosupresos, niños, adultos mayores o mujeres embarazadas (CDC 2020). *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Pullorum no representan un problema grave para la salud pública, debido a que se han adaptado muy bien a su huésped natural, mientras que la paratifosis aviar, provocada por *Salmonella* Enteritidis sí es de gran importancia zoonótica (Terzolo 2009). Comprende una de las mayores causas de hospitalizaciones y muertes en el mundo, adquiriéndose principalmente por el consumo de carne de pollo y huevos contaminados (Fandiño y Verjan 2019).

Así, en seres humanos los agentes más comunes de gastroenteritis corresponden a *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, los cuales cuentan con un periodo de incubación de aproximadamente 12-36 horas antes de la aparición de síntomas como fiebre leve, dolor abdominal, náuseas y diarrea. Para algunas personas la enfermedad es autolimitante en un periodo de cuatro a siete días, sin embargo, la excreción de la bacteria en heces puede perdurar hasta tres meses en pacientes asintomáticos (Forsythe 2010).

En cuanto a la patogénesis de salmonelosis, la dosis infectiva es de 10^5 a 10^7 UFC por gramo de alimento; sin embargo, esto puede variar según el estado de salud

de la persona, el inóculo y la virulencia de la cepa (Jiménez 2016). *Salmonella enterica* se fija a las células epiteliales del íleon, pasa por un proceso de endocitosis hacia el interior de estas, permanece dentro de una vacuola donde se multiplica y se libera en la lámina propia de la mucosa. Posteriormente, se da la llegada de células inflamatorias, se liberan prostaglandinas y enterotoxinas, se activa la enzima adenilato ciclasa y se producen fluidos hacia el lumen intestinal (Adams et al. 2016).

Salmonella cuenta con mecanismos de virulencia que le permiten sobrevivir dentro de los organismos a los que infecta. Se caracteriza por poseer una variedad de genes que al expresarse aumentan su patogenicidad, los cuales se encuentran agrupados en islas genómicas, conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* o SPIs (Espinoza et al. 2017). Durante el proceso infeccioso, la bacteria debe seleccionar los genes a expresar para adaptarse a los cambios ambientales que se le presentan (Figueroa y Verdugo 2005).

Actualmente, se han descrito un total de 23 SPIs, sin embargo, sólo cinco se encuentran presentes en todos los serovares de *Salmonella enterica*, incluyendo SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5, los restantes pueden variar dependiendo del serovar (Hensel 2004; Blondel et al. 2009). La SPI-1 cuenta con genes de invasión, apoptosis de macrófagos y otros que inducen la activación de cascadas de fosforilación MAP cinasas dependientes. Las SPI-2 y SPI-3 contienen genes que favorecen la supervivencia y replicación de *Salmonella* dentro de los macrófagos y enterocitos. Además, una de las vías que utiliza la bacteria para ingresar y sobrevivir en células no fagocíticas es el sistema de secreción tipo III, el cual es codificado por genes de la SPI-2. La SPI-4 permite la codificación de sistemas de secreción tipo I. Por su parte,

la SPI-5 comprende genes que participan en la secreción de fluidos y la reacción inflamatoria que se induce en la mucosa del intestino (Figueroa y Verdugo 2005).

De todas las SPIs descritas por la literatura, la más importante es la SPI-7, siendo la isla de mayor patogenicidad y de mayor tamaño, comprendiendo hasta 134kb y es específica de los serovares Typhi, Paratyphi y Dublin (Hensel 2004; Seth 2008). En el caso de *Salmonella* Typhi, está presente el polisacárido capsular Vi, el cual se regula, biosintetiza y exporta gracias al locus *viaB*, de 14 kb, que se ubica dentro de la región del ADN comprendida por la SPI-7, su principal función consiste en prevenir que se dé el reconocimiento de inmunidad innata por el sistema de complemento (Wilson et al. 2011).

El abordaje terapéutico de la enteritis por *Salmonella enterica* va a depender de la gravedad del caso, cuando hay deshidratación se recomienda el suministro de electrolitos para lidiar con la pérdida de fluidos por diarrea o vómito. El uso de antimicrobianos sistémicos se limita a los grupos de riesgo, es decir personas en las que su sistema inmunológico es menos eficiente, además la terapia a elegir debe basarse en los patrones de resistencia locales (OMS 2018b). Generalmente este tratamiento consiste en terapias con cefalosporinas de tercera generación, como la ceftriaxona, además de otros betalactámicos como la amoxicilina y la ampicilina (Ibarra et al. 2005).

Existen reportes de efectividad *in vitro* ante la infección por *Salmonella* de las fluoroquinolonas, pero clínicamente no han demostrado ser eficientes y también se reporta el uso de azitromicina (Gómez 2017). Sin embargo, los antibióticos de elección suelen ser las cefalosporinas de tercera generación (Ibarra et al. 2005; Gonzales

2015). En caso de que se presente resistencia a los antibióticos de elección, se ha recurrido con éxito a cefalosporinas de cuarta generación como cefepima en niños (Contreras et al. 2021).

1.1.4 Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* en pollo para consumo humano

La OMS define la resistencia a los antimicrobianos como un fenómeno por medio del cual un microorganismo que anteriormente se veía afectado por un antimicrobiano, deja de ser susceptible al mismo, esto ocurre porque logran neutralizar el efecto del fármaco, ya sea adquiriendo genes de resistencia o por medio de mutaciones (OMS 2020b). Los antibióticos funcionan como un factor de selección, permitiendo que sobrevivan las bacterias que mejor resistan a la presencia del fármaco (Errecalde 2004).

La OPS menciona que existen seis principales causas de resistencia a los antibióticos: prescripción innecesaria, no finalizar los tratamientos, uso excesivo en el sector pecuario, déficit de control de enfermedades intrahospitalarias, malas medidas de sanidad e higiene y faltante en el desarrollo de nuevos antibióticos (OPS 2017).

La contribución por parte de los sistemas de producción animal, a la resistencia a los antibióticos, radica en que se han utilizado antimicrobianos, con fines no terapéuticos, sino como promotores de crecimiento, administrando dosis más bajas que las recomendadas terapéuticamente, para de este modo reducir la microbiota intestinal que compite con el huésped por nutrientes y también tratar alguna enfermedad subclínica que no ha sido correctamente diagnosticada, con el objetivo de aumentar el rendimiento productivo (INFOSAN 2005). Existen reportes de

contaminación de fuentes de agua y alimentos, debido al uso excesivo de medicamentos en enfermedades que no han sido adecuadamente diagnosticadas (Arenas y Moreno 2018).

Las bacterias pueden ser resistentes a un antimicrobiano por factores intrínsecos, como la falta de un punto diana específico, pero también existe la resistencia adquirida, la cual se logra gracias a mutaciones cromosómicas, es decir cambios estructurales en su material genético o por medio de resistencia transferible, mediada por plásmidos, transposones o integrones (Pérez 1998). En cuanto a los mecanismos empleados para alcanzar la resistencia se tiene la inactivación mediada por enzimas, modificaciones que vuelven impermeable la membrana o pared celular, mecanismos activos de expulsión del fármaco y modificaciones del sitio blanco que tiene el antibiótico en la célula bacteriana (Errecalde 2004).

El principal mecanismo que emplean las Enterobacterias para desarrollar resistencia a los betalactámicos es la producción betalactamasas, las BLEEs son enzimas que hidrolizan las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemas, pero que se inhiben con ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (García et al. 2010; Paciel et al. 2011). En los últimos años a nivel global se ha dado un aumento en el aislamiento de Enterobacterias, específicamente del género *Salmonella* que presentan genes de resistencia a los betalactámicos que codifican para betalactamasas, dentro de los cuales se encuentran los $bla_{CTX\text{-}M}$ y $bla_{CMY\text{-}2}$. Estos aislamientos deben ser considerados un problema de salud pública, debido a que se reportan tanto en poblaciones humanas, como en animales (Martin et al. 2012; Gonzales 2015). Para el año 2018 el INCIENSA confirmó la presencia del gen

bla$_{CTX-M-65}$ en el serovar de *Salmonella* Infantis por medio de WGS, además en este mismo serovar se encontró la betalactamasa AmpC plasmídica tipo CMY-2, por medio de PCR (INCIENSA 2020).

El gen *bla*$_{CTX-M}$ fue descubierto en 1989 presente en *Escherichia coli,* el cual se caracteriza por codificar enzimas que se encargan de hidrolizar cefotaxima; actualmente se encuentra ampliamente disperso y se cree que su éxito radica en estar presente en plásmidos y en asociación con integrones (García et al. 2010). La familia de *bla*$_{CMY-2}$ es codificada por AmpC β-lactamasa y confiere resistencia a ceftriaxona y ceftiofur, además ante el ácido clavulánico (Heider et al. 2009).

Otros genes de importancia para la salud pública son los asociados con resistencia a los aminoglucósidos, tales como el *aac(6')-Iaa_1*, ligado generalmente con amikacina, el *aac(3)-IVa_1*, mayormente asociado con gentamicina y tobramicina, *ant(3'')-Ia_1*, relacionado con estreptomicina, *aph(3')-IIa_2*, *aph(3')-Ia_7*, *aph(3')-Ia_9*, *aph(4)-Ia_1* y *aph(6)-Id_1*, asociados con kanamicina. Además, un gen relevante es el *strA_1*, asociado igualmente con resistencia a los aminoglucósidos (UniProt 2021; CDC 2021a).

Estudios recientes mencionan genes relevantes asociados con resistencia a tetraciclinas, tales como *tet(A)_4*, *tet(A)_6* y *tet(B)_2*, mientras que otros genes como el *sul1_5* se asocia con resistencia a los antagonistas del folato, como el sulfametoxazol; el en *floR_2* con el cloranfenicol, el *fosA3_1* con la fosfomicina y el sul1_5 con las sulfonamidas (Xiaoliang et al. 2019; UniProt 2021).

En el año 2017 la OMS publicó por primera vez una lista de patógenos prioritarios, resistentes a los antibióticos, estableciendo tres categorías: Prioridad 1:

Crítica, Prioridad 2: Elevada y Prioridad 3: Media. *Salmonella* resistente a las flouroquinolonas se ubica en la segunda categoría, presentando una farmacorresistencia creciente (OMS 2017). Por su parte el Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana de los Estados Unidos, para ese mismo año reportó que un 1% de aislamientos de *Salmonella* no tifoidea, recuperados de casos clínicos humanos, presentaron disminución de la susceptibilidad a la azitromicina, una resistencia del 3% a ceftriaxona y un aumento del 8% de resistencia a ciprofloxacina. Además, un 16% de los aislamientos resultó resistente al menos a un antibiótico esencial, mientras que un 2% arrojaron resultados de resistencia a tres o más antibióticos esenciales (CDC 2019a).

Un estudio realizado en el año 2012 en una planta procesadora comercial de Costa Rica determinó que cepas de *Salmonella* aisladas de canales de pollo presentaban 100% de susceptibilidad a gentamicina y ciprofloxacina, pero se encontró algún grado de resistencia en un 8% a ampicilina, 4% a ceftriaxona, 8% a cloranfenicol y 92% a trimetoprima sulfametoxazol (Rivera 2012). Para el año 2013 en Costa Rica, según el informe del Centro Nacional de Referencia de Bacteriología del INCIENSA, se recibieron un total de 235 aislamientos de *Salmonella* de origen humano, encontrándose en ellos 34 serovares distintos; al menos cuatro casos fueron asociados al consumo de mayonesa casera y diez casos al consumo de carne de pollo, se seleccionaron 200 aislamientos para realizar un análisis de susceptibilidad a los antibióticos y se determinó un 6% de resistencia al ácido nalidíxico, 0.5% de resistencia a trimetoprima sulfamethoxazol, 1% de presencia de BLEEs, 1.5% de resistencia ante: ampicilina, cloranfenicol, tetraciclinas, sulfonamidas, piperacilina, estreptomicina,

piperacilina-tazobactam. Además, se confirmaron 113 aislamientos de *Salmonella* de origen no humano, de los cuales fueron analizados un total de 36 aislamientos, el 100% resultó susceptible ante cefalosporinas de tercera generación, 50% de susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina y un 2.7% fue resistente al mismo. De origen aviar se reportaron principalmente *S.* Gallinarum, *S.* Enteritidis y *S.* Typhimurium, mientras que en ambiente las más relevantes fueron *S.* Javiana y *S*. Altona (INCIENSA 2013a).

El último informe de vigilancia de INCIENSA basado en laboratorio para *Salmonella* spp, comprende las cepas aisladas en los laboratorios pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología de Costa Rica que fueron enviadas al CNRB en el periodo comprendido entre enero a diciembre del año 2018, además de algunos aislamientos realizados en el CNRB. En dicho informe se confirmaron 248 aislamientos de *Salmonella* de origen humano, sobresaliendo el serovar Typhimurium con 16% del total de aislamientos. Para los 248 aislamientos se obtuvo resistencia intermedia a ciprofloxacina en un 7.7%, un 8.5% de resistencia a cefalosporinas de tercera generación como la ceftazidima y cefotaxima, un 9.7% presentó resistencia a ampicilina y un 3.2% a trimetoprima sulfametoxazol. Por otro lado, todos los aislamientos analizados resultaron sensibles a los carbapenemes como el imipenem y el meropenem (INCIENSA 2020).

En Costa Rica la Dirección de Medicamentos Veterinarios cuenta con una dependencia llamada Departamento de Farmacovigilancia, que integra la Comisión Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos Transmitida por los Alimentos, encargándose de velar por la seguridad en el uso de estos medicamentos, principalmente en animales destinados a consumo humano (MAG 2014).

1.2 Justificación

Las enfermedades diarreicas corresponden la mitad de la carga mundial de ETAs, siendo *Salmonella* no tifoidal una de las cuatro principales causas de diarrea a nivel global, acompañada de *E. coli*, *Campylobacter* y Norovirus (OMS 2015). Para el año 2010 los agentes etiológicos asociados a enfermedades diarreicas fueron la causa de 230 000 muertes en el mundo, sobresaliendo entre ellos *Salmonella* no tifoidal (FERG 2015).

Según la estimación efectuada por la OMS para el año 2010, la carga mundial de ETAs fue de 33 millones de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVAD) (FERG 2015). Un AVAD representa un año de vida saludable perdido (Seuc et al. 2000). Por su parte, la carga mundial de *Salmonella* no tifoidal para el año 2010 fue de 4 millones de AVAD (FERG 2015).

En Costa Rica *Salmonella* es una de las principales causas de diarreas reportadas, debido al consumo de alimentos contaminados, junto con otros agentes bacterianos como *Shigella*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*. Además, agentes virales como Adenovirus y Norovirus (INCIENSA 2013b). Las principales fuentes alimenticias asociadas a la adquisición de *Salmonella* no tifoidal son la carne de ave y los huevos (OMS 2019).

Según los datos que brinda la Asociación Latinoamericana de Avicultura, el consumo per cápita de carne de pollo en la región ha venido creciendo de manera exponencial en los últimos años, reportándose para el 2019 un consumo aparente de 30.2 Kg por persona al año (ALA 2019). La avicultura en Costa Rica representa el 0.73% del Producto Interno Bruto con un valor agregado del 10.9% de las actividades

primarias del sector agropecuario, siendo un 8.2% para pollo y un 2.7% para huevo (SENASA 2020a). El impacto económico de la salmonelosis en las granjas avícolas radica en las pérdidas asociadas a una conversión alimenticia deficiente, además a nivel de la industria de alimentos se producen pérdidas por destrucción de carcasas contaminadas y sanciones sanitarias (Insunza y Soto 1998).

La economía de un país también se puede ver afectada debido a los gastos en los que incurre el sistema de salud para brindar atención y tratamiento a las personas afectadas (Adams 2016). En los Estados Unidos cada año aproximadamente un millón de personas enferman por *Salmonella* no tifoidal, adquirida de alimentos contaminados (USDA 2015). Para el año 2013, según el Servicio de Investigación Económica del USDA, 35% de las hospitalizaciones por ETAs correspondieron a *Salmonella* no tifoidal, siendo el costo total de enfermedad de $3.7 mil millones (USDA 2013).

Aunado al efecto negativo para la economía que representa la salmonelosis, existe actualmente una preocupación global en cuanto al futuro de los antibióticos como agentes farmacológicos en el tratamiento de enfermedades bacterianas, ya que el uso inadecuado de los mismos ha provocado que la resistencia avance aceleradamente. Por este motivo es necesario contar con investigaciones propias a nivel país en el tema de resistencia a los antibióticos, a razón de conocer la susceptibilidad de las cepas bacterianas circulantes.

Determinar la resistencia de *Salmonella* a nivel genético permite descartar familias de antibióticos que no son efectivas en el tratamiento de salmonelosis en seres humanos y optimiza la búsqueda del medicamento más idóneo, según sea el caso. La detección de genes de resistencia en la familia de los betalactámicos, los cuales

corresponden al tratamiento de elección en seres humanos, ofrece una perspectiva cualitativa de la realidad nacional, y motiva a realizar más investigaciones en el área para conocer acerca de la prevalencia. Además, dada la capacidad de transmisión de genes de resistencia entre bacterias del género *Salmonella* y otras enterobacterias conocer los genes de resistencia permite estar preparados ante la aparición de otras bacterias resistentes para las cuales el abordaje es por medio de antibióticos.

Esta investigación también busca concientizar a la industria avícola sobre la importancia que tiene la prevención de esta enfermedad, no sólo por su impacto en la economía sino en la salud pública, así como motivar a realizar un adecuado diagnóstico y monitoreo de *Salmonella* en granja, que evite tratamientos empíricos con antibióticos de amplio espectro sin ninguna justificación médica, los cuales son uno de los principales contribuyentes a la resistencia antimicrobiana.

Ante esta situación, la presente investigación ofrece resultados preliminares de la epidemiología de *Salmonella* en la cadena de producción avícola de Costa Rica, dando a conocer los antibióticos que aún pueden ser efectivos para el tratamiento de salmonelosis y alertando sobre aquellos que dejaron de serlo. Además, incentiva al fortalecimiento de las medidas preventivas y de bioseguridad para la disminución del riesgo, tanto en planta de procesamiento, como al momento de preparar la carne de pollo para consumo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

1.3.1.1 Determinar los perfiles de susceptibilidad a 20 antibióticos y genes de resistencia a betalactámicos en aislamientos de *Salmonella* recuperados en tres matrices dentro de la cadena de producción de pollo de engorde en Costa Rica.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Identificar los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *Salmonella* recuperados de heces, carcasas y alimentos balanceados de la producción avícola.

1.3.2.2 Determinar las frecuencias de resistencia y multirresistencia de los aislamientos de *Salmonella* provenientes de las tres matrices evaluadas.

1.3.2.3 Determinar la presencia de los genes $bla_{CTX\text{-}M}$ y $bla_{CMY\text{-}2}$ en aislamientos de *Salmonella* con perfil de resistencia a los betalactámicos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Procedencia de los aislamientos

En este estudio observacional trasversal, un total de 104 aislamientos de *Salmonella* spp, fueron caracterizados fenotípica y genotípicamente para evaluar su susceptibilidad ante diversos antimicrobianos. Dichos aislamientos fueron obtenidos en el segundo semestre del año 2019, como parte del proyecto titulado *"Análisis de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entéricas aisladas en diferentes puntos de la cadena de producción avícola nacional"* inscrito bajo el código B-9252 de la UCR y del proyecto SIA 0648-19 titulado *"Diversidad genómica de Salmonella enterica y genes de resistencia a los antimicrobianos en poblaciones humanas animales y alimentos en Costa Rica*" de la UNA. Para dicho estudio se colectaron 300 muestras en total, provenientes de tres matrices asociadas con la cadena de producción de pollo de engorde, para la determinación de la prevalencia de *Salmonella,* obteniéndose 104 aislamientos, (n = 63) de contenido cecal de pollos de engorde, (n = 38) de pollo en piezas: pechuga deshuesada, alitas, muslo entero y muslo deshuesado, adquiridas en puntos de venta y (n = 3) de alimentos balanceados para pollos de engorde. Todos los aislamientos fueron recuperados siguiendo un protocolo previamente descrito (Muñoz et al. 2017). Se confirmaron por medio de las pruebas fenotípicas LIA y TSI, además se efectuó la prueba serológica de aglutinación con antisuero polivalente para *Salmonella*. Posteriormente, fueron almacenados a -80°C en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA), de la

Universidad de Costa Rica y fueron utilizados para su caracterización en el presente estudio.

2.2 Procesamiento de las muestras

2.2.1 Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer

El análisis de susceptibilidad a los antibióticos se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología del CINA, en la Universidad de Costa Rica y el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, por medio del método de Kirby-Bauer, descrito en el documento M02-A13, según el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI 2019), utilizando los siguientes antibióticos: amikacina, gentamicina, ampicilina, cefazolina, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, meropenem, ertapenem, amoxicilina clavulanato, piperacilina tazobactam, cloranfenicol, azitromicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, nitrofurantoina y trimetoprima sulfametoxazol. De los anteriores únicamente gentamicina, amoxicilina, ciprofloxacina y trimetoprima sulfametoxazol se encuentran registrados para uso veterinario en avicultura en Costa Rica (Medivet 2021).

Como cepa control se utilizó *Escherichia coli (*ATCC 25922). Inicialmente se realizó una suspensión de colonias de *Salmonella* en solución salina, provenientes de un plato de agar para métodos estándar con 18 a 24 horas de incubación. Se ajustó la suspensión hasta alcanzar una turbidez equivalente con el estándar de McFarland 0.5, utilizando el instrumento DensiCHEK^{TM} Plus (bioMérieux, North Carolina, USA 2016).

Cada aislamiento se procesó individualmente. Se introdujo un hisopo estéril en el inóculo, asegurando que no se encontrara excesivamente húmedo, haciendo una leve presión en los bordes del tubo de ensayo antes de retirarlo del mismo. Seguidamente, se inoculó la placa de Agar Müller-Hinton, procurando cubrir la totalidad de la placa, se repitió dos veces rotando la placa aproximadamente 60° entre cada rayado, todo lo anterior sin exceder los 15 minutos desde su preparación. Además, se bordeó la placa de Petri con el hisopo para asegurar la eliminación de un exceso de inóculo dentro de la misma.

Se dejó la tapa de la placa entreabierta por unos tres a cinco minutos, sin exceder los 15 minutos en este paso, para asegurar que estuviera seca antes de continuar con las demás partes del procedimiento.

Posteriormente mediante una pinza estéril se posicionó cada sensidisco impregnado con antibiótico haciendo una leve presión sobre el mismo para asegurarse de que hiciera contacto con el inóculo. Las placas se incubaron a una temperatura de 35°± 2°C, por 16 a 18 horas. Luego se procedió a la medición del halo de inhibición en milímetros utilizando una regla, la cual se posicionó en el centro de cada disco, abarcando la totalidad del diámetro del halo.

2.2.2 Determinación de la presencia del gen *bla*$_{CMY-2}$

2.2.2.1 Extracción de ADN

Para este procedimiento se utilizó el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Handbook (Qiagen, Germany 2020), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se indujo una lisis de la muestra, utilizando proteinasa K. Por medio de

una solución buffer se mantuvo unido el material genético y se llevó a cabo un lavado para desechar contaminantes en la muestra, finalmente se realizó una elución para extraer el material genético de interés, es decir el ADN. Para la cuantificación del ADN se utilizó el espectroflourómetro Invitrogen Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Singapore 2017), basado en fluorescencia, que se caracteriza por su alta precisión y sensibilidad.

2.2.2.2 Criterio de inclusión

Para efectuar la técnica de PCR se seleccionaron aquellas extracciones de ADN con una relación A260/280 entre 1.8 a 2.0, lo que indica una pureza óptima, además de una concentración > 50 µg/µL (Banco Nacional de ADN Carlos III 2020).

2.2.2.3 Determinación de la presencia del gen bla_{CMY-2} por PCR convencional

La determinación de la presencia del gen bla_{CMY-2} se llevó a cabo en los Laboratorios de Salud Pública e Inocuidad de Alimentos y en el Laboratorio de Bioquímica de la EMV-UNA. Se realizó la técnica de PCR convencional en aislamientos con perfil de resistencia a la familia de los betalactámicos, utilizando como cepa control *Salmonella Typhimurium* (OPS-216), brindada por el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología del INCIENSA, la cual era portadora de una betalactamasa tipo AmpC plasmídica, codificada por el gen bla_{CMY-2}. Esta cepa fue aislada de hemocultivo de un paciente humano con bacteriemia.

El procedimiento de la técnica de PCR se basó en el manual del producto Platinum Green Hot Start PCR 2X Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen,

USA 2015). Se agregaron 6 µL de agua libre de nucleasas en un tubo para PCR, luego 10 µL de la mezcla de reactivos lista para su uso Platinum Green Hot Start PCR 2X Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, USA 2015), que contiene Platinum *Taq* ADN polimerasa en una solución amortiguadora para PCR con MG^{2+} y dNTPs. Además, está suplementada con tintes de seguimiento para la carga directa de los productos del PCR en el gel. A la mezcla se le agregó 1 µL del cebador bla_{CMY-2} Forward y 1 µL de bla_{CMY-2} Reverse, 2 µL del ADN extraído de los aislamientos de *Salmonella* y finalmente 4 µL del potenciador Platinum Enhancer (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, USA 2015).

Durante el termociclaje se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94°C durante 30 segundos, luego se realizaron 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, con una temperatura de hibridación de 60°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C por un minuto, una vez finalizado este proceso se mantuvo a 4°C. Finalmente, se realizó una electroforesis capilar para visualizar la reacción del PCR, utilizando el instrumento QIAxcel Advanced (Pérez y Hanson 2002; Qiagen, Germany 2016).

En el Cuadro 1 se muestran las secuencias de nucleótidos que se utilizaron para la identificación de los genes en estudio.

Cuadro 1.

Cebadores utilizados para la detección de genes de resistencia de BLEEs sintetizados con base en la secuencia de nucleótidos de NCBI, 2021.

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño de amplicón (pb)
bla_{CMY}	$bla_{CMY2\text{-}F}$	TTCTCCTGAACGTGGCTGGC	98
	$bla_{CMY2\text{-}R}$	GGACAACTTGACGCCGAAGC	

2.3 Criterios de interpretación

2.3.1 Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer

Los resultados obtenidos en la determinación de susceptibilidad a los antibióticos para cada aislamiento de *Salmonella* se clasificaron en las siguientes categorías según sea el caso: *Susceptible* y *Resistente (Intermedia o Resistente*), de acuerdo con los puntos de corte del documento M100-ED32 (CLSI 2022). Además, se tomaron como multirresistentes aquellos aislamientos con resistencia a tres o más familias de antibióticos (NARMS 2019). En el Cuadro 2 se muestra la clasificación utilizada en el presente estudio.

Cuadro 2.

Puntos de corte para Enterobacterias basados en el CLSI, 2022.

Antibiótico*	Contenido de disco (µg)	Halo de inhibición (mm)		
		Susceptible ≥	Resistente	
			Intermedio	Resistente ≤
AMK	30	17	15-16	14
GEN	10	15	13-14	12
AMP	10	17	14-16	13
KZ	30	23	20-22	19
FOX	30	18	15-17	14
CTX	30	26	23-25	22
CAZ	30	21	18-20	17
FEP	30	25	-	18
ATM	30	21	18-20	17
IMP	10	23	20-22	19
MEM	10	23	20-22	19
ETP	10	22	19-21	18
AMC	20-10	18	14-17	13
TZP	100-10	25	24-21	20
CHL	30	18	13-17	12
AZT	15	13	-	12
NAL	30	19	14-18	13
CIP	5	31	21-30	20
NIT	300	17	15-16	14
SXT	1.25-23.75	16	11-15	10

* AMK= Amikacina, GEN= Gentamicina, AMP= Ampicilina, KZ= Cefazolina, FOX= Cefoxitina, CTX= Cefotaxima, CAZ= Ceftazidima, FEP= Cefepima, ATM= Aztreonam, IMP= Imipenem, MEM= Meropenem, ETP= Ertapenem, AMC= Amoxicilina clavulanato, TZP= Piperacilina tazobactam, CHL= Cloranfenicol, AZT= Azitromicina, NAL= Ácido nalidíxico, CIP= Ciprofloxacina, NIT= Nitrofurantoína, SXT= Trimetoprima sulfametoxazol.

2.3.2 Procedimientos llevados a cabo como parte del proyecto inscrito bajo el código B-9252 de la UCR, realizado por el Centro de Investigación en Nutrición Animal de forma paralela a la presente investigación

Una vez que los 104 aislamientos de *Salmonella* fueron caracterizados fenotípicamente en la presente investigación por el Método de Kirby-Bauer se eligieron para secuenciación de genoma completo 71 aislamientos de provenientes de planta de procesamiento y punto de venta, los cuales contaban con perfil de resistencia a la familia de los betalactámicos, esto con el fin de determinar la presencia de genes de resistencia a los betalactámicos. Para esto se extrajo el ADN y fueron enviados por parte del CINA al Instituto Bernhard Nocht, Alemania.

2.2.3.1 Secuenciación de genoma completo

Se extrajo el ADN de los 71 aislamientos de *Salmonella* por medio del kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Handbook (Qiagen, Germany 2020). Posteriormente, fueron enviados al Instituto Bernhard Nocht, ubicado en Alemania, donde se efectúo la secuenciación de genoma completo, según la metodología descrita en la Guía de Secuenciación con tecnología Illumina © (Illumina, USA 2021), a cargo de la Dra. Andrea Molina Alvarado.

El primer paso fue la preparación de las bibliotecas, utilizando la biblioteca Illumina Nextera XT, en este paso el ADN fue fragmentado en sitios específicos que posteriormente se unieron por medio de adaptadores. Luego ocurrió la generación de grupos en una celda de flujo, por medio de MiSeq, la cual es una celda de tipo aleatorio, donde los fragmentos de cada biblioteca fueron clonados. Seguidamente se dio la

secuenciación por síntesis, donde los nucleótidos se marcaron con fluorescencia y se fueron uniendo a la cadena de ADN, luego cada una de las bases de datos emitió una intensidad de longitud de onda que la hizo identificable. Finalmente se dio el análisis de datos, con el fin de determinar los serovares de *Salmonella enterica* y la presencia de genes de resistencia a los antimicrobianos.

2.3.2.1 Tipificación y determinación de los serovares de *Salmonella enterica* con MLST versión 2 19.0 y SISTR versión 1.1.1

Con el software MLST versión 2 19.0 (Jolley et al. 2018) se dio la tipificación de secuencias multilocus, utilizando las secuencias de fragmentos internos de siete genes de mantenimiento. Para cada gen de mantenimiento, se asignaron como alelos las secuencias pertenecientes a una especie bacteriana. Los alelos en cada uno de los loci de los genes de mantenimiento definieron el perfil alélico o ST de los aislamientos. Se obtuvieron una serie de siete números enteros que representaron a los alelos en cada uno de los siete loci de mantenimiento, los cuales caracterizaron a la especie bacteriana.

Para la determinación de los serovares de *Salmonella* se utilizó el software SISTR versión 1.1.1 (Yoshida et al. 2016) donde se incluyó el genoma bacteriano para la realización de tipificación molecular in silico.

2.3.2.2 Determinación de la presencia de genes *bla*$_{CMY-2}$ y *bla*$_{CTX-M}$ en bacterias del género *Salmonella* con ResFinder versión 4.0

Con la información obtenida de la secuenciación de genoma completo con tecnología Illumina en formato FASTQ se recurrió a la base de datos ResFinder versión 4.0 (Bortolaia et al. 2020), la cual detecta una serie de genes asociados a resistencia antimicrobiana de interés para la salud pública, presentes en aminoglucósidos, betalactámicos, diarilquinolinas, quinolonas, fluoroquinolonas, antagonistas del folato, glucopéptidos como la vancomicina, fosfonatos, lincosamidas, macrólidos, nitroimidazoles, oxazolidinonas, fenicoles, polimixinas como la colistina, rifamicinas y tetraciclinas. Todos los anteriores de importancia en medicina humana y veterinaria (Bortolaia et al. 2020).

2.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo, con el fin de determinar los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos en estudio (N = 104), la presencia de genes de resistencia a los betalactámicos (n = 71) y el grado de susceptibilidad en cada una de las diferentes matrices de la cadena de producción avícola: planta de procesamiento (n = 63), punto de venta (n = 38) y alimentos balanceados (n = 3).

Se comparó la relación entre los perfiles de resistencia y la presencia de genes de resistencia (variables dependientes), con la procedencia de los aislamientos (variable independiente).

Se compararon los resultados obtenidos en punto de venta con los de planta de cosecha por medio de la prueba exacta de Fisher, haciendo uso del software

estadístico MedCalc Version 20.027 (MedCalc 2022), tomando como diferencias estadísticamente significativas los valores de $p<0.05$.

2.4.1 Definición de variables

2.4.1.1 Variables independientes

Cada uno de los tres niveles de la cadena de producción avícola analizados: plantas de cosecha, puntos de venta y alimento para aves.

2.4.1.2 Variables dependientes

Los perfiles de resistencia a los antibióticos de cada una de las cepas, la presencia de genes de resistencia y el grado de resistencia en cada una de las matrices de la cadena de producción avícola.

3 RESULTADOS

3.1 Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer

Los antibióticos betalactámicos cefazolina y ertapenem presentaron un porcentaje de resistencia correspondiente a 100%. Por su parte la resistencia a imipenem y piperacilina tazobactam se evidenció en un menor porcentaje de aislamientos, con apenas un 1.0% en ambos antibióticos.

Los fenicoles representados en la presente investigación por el cloranfenicol tuvieron un alto porcentaje de aislamientos resistentes, correspondientes a un 91.1%. En las quinolonas, específicamente en el ácido nalidíxico se evidenció un 93.1% de resistencia, mientras que en los nitrofuranos como la nitrofurantoína un 94.1%.

En el caso de cefalosporinas de tercera generación, ceftazidima presentó un 15.8% de resistencia, mientras que cefotaxima contaba con un 65.4%, tal y como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3.

Distribución de resistencia (R, %) en 101 aislamientos recuperados de planta de cosecha y punto de venta, según el método de Kirby-Bauer.

ATB*	Halo de inhibición (mm)																		
	≤10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23-24	25	26-29	30	≥31	R (%)
AMK	**2**	**0**	**0**	**0**	**0**	0	0	0	0	1	7	11	19	35	18	8	0	0	2 (2.0)
GEN	**47**	**32**	**6**	3	1	0	0	0	1	0	1	0	3	5	2	0	0	0	89 (88.1)
AMP	**79**	**1**	**0**	**0**	0	1	0	0	0	0	2	3	2	7	4	2	0	0	81 (80.2)
KZ	**19**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**2**	**2**	10	2	0	0	0	0	0	0	35 (100)
FOX	**1**	**0**	**0**	**2**	**3**	1	6	1	4	3	20	14	11	12	15	8	0	0	14 (13.9)
CTX	**48**	**6**	**7**	**2**	**0**	**0**	**0**	**1**	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	1	0	8	10	17	66 (65.4)
CAZ	**0**	**0**	**1**	**0**	**4**	**5**	**4**	**0**	1	0	1	4	7	29	8	28	6	2	16 (15.8)
FEP	**0**	**4**	**4**	**1**	**4**	**4**	**1**	**0**	**0**	0	2	11	4	17	19	12	5	13	52 (51.5)
ATM	**10**	**7**	**6**	**4**	**6**	**3**	**8**	**4**	3	4	6	2	1	1	0	9	11	16	61 (60.4)
IMP	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	1	0	0	0	6	48	28	18	1 (1.0)
MEM	**8**	**4**	**6**	**0**	**3**	**7**	**2**	**2**	**0**	**0**	1	0	0	0	0	8	14	46	33 (32.7)
ETP	**1**	**1**	**3**	**4**	**2**	**7**	**5**	**1**	**4**	0	4	2	0	0	0	0	0	0	34 (100)
AMC	**20**	**0**	**0**	**0**	0	0	1	1	1	3	7	2	8	18	15	23	2	0	22 (21.8)
TZP	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	0	0		0	0	10	20	47	16	7	1 (1.0)
CHL	**90**	**0**	**0**	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	1	2	2	0	1	92 (91.1)
AZT	**4**	**2**	**10**	8	8	19	3	6	1	2	13	6	6	5	8	0	0	0	16 (15.8)
NAL	**94**	**0**	**0**	**0**	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	1	1	0	0	94 (93.1)
CIP	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**	0	0	3	5	46	23	22	79 (78.2)
NIT	**94**	**0**	**0**	**0**	**1**	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	1	0	0	95 (94.1)
SXT	**2**	0	0	0	0	0	0	0	2	3	11	6	8	19	16	32	1	1	2 (2.0)

* AMK= Amikacina, GEN= Gentamicina, AMP= Ampicilina, KZ= Cefazolina, FOX= Cefoxitina, CTX= Cefotaxima, CAZ= Ceftazidima, FEP= Cefepima, ATM= Aztreonam, IMP= Imipenem, MEM= Meropenem, ETP= Ertapenem, AMC= Amoxicilina clavulanato, TZP= Piperacilina tazobactam, CHL= Cloranfenicol, AZT= Azitromicina, NAL= Ácido nalidíxico, CIP= Ciprofloxacina, NIT= Nitrofurantoína, SXT= Trimetoprima sulfametoxazol. Para KZ N = 35 y para ETP N = 34. Los números resaltados en negrita son los valores resistentes, las celdas en color gris representan los valores intermedios, los cuales también fueron considerados como resistentes. Las líneas verticales representan el límite a partir del cual se considera susceptible. Puntos de corte basados en el CLSI 2022.

Se evidenció la presencia de resistencia a los antibióticos en planta de cosecha y punto de venta, para las familias de aminoglucósidos, betalactámicos, fenicoles, macrólidos, quinolonas, fluoroquinolonas, nitrofuranos y antagonistas del folato. Además, se determinó una diferencia significativa ($p<0.05$) en meropenem al comparar los resultados de planta de cosecha con punto de venta, encontrándose mayor resistencia en planta de cosecha.

En planta de cosecha los antibióticos con el porcentaje más alto de resistencia fueron cefazolina y ertapenem con 100% de resistencia en ambos antibióticos, mientras que se presentó un 0.0% de resistencia a imipenem y piperacilina tazobactam, y un 1.6% de resistencia a trimetoprima sulfametoxazol.

En punto de venta los antibióticos a los cuales se presentó el porcentaje más alto de resistencia fueron cefazolina y ertapenem con un 100%, además nitrofurantoína con un 94.7%. Por otro lado, los otros antibióticos que presentaron menor resistencia en punto de venta fueron amikacina con 0.0%, imipenem con 2.6%, al igual que piperacilina tazobactam y trimetoprima sulfametoxazol, tal y como se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4.

Distribución de aislamientos (n, %) de Salmonella enterica resistentes a los antibióticos, utilizando el método de Kirby-Bauer, según su origen en la cadena de producción avícola de Costa Rica.

Familia	Antibiótico	Número de aislamientos (%) N = 101		OR	IC 95%	Valor *p*
		Planta de cosecha n = 63	Punto de venta n = 38			
Aminoglucósidos	AMK	2 (3.2)	0 (0.0)	3.1301	0.1463 - 66.9588	0.4653
	GEN	58 (92.1)	31 (81.6)	2.6194	0.7674 - 8.9409	0.1242
Betalactámicos	AMP	49 (77.8)	32 (84.2)	0.6563	0.2285 - 1.8848	0.4339
	KZ*	30 (100)	5 (100)	5.5455	0.0992 - 310.0586	0.4041
	FOX	9 (14.3)	5 (13.2)	1.1000	0.3394 - 3.5651	0.8738
	CTX	38 (60.3)	28 (73.7)	0.5429	0.2249 - 1.3101	0.1741
	CAZ	12 (19.1)	4 (10.5)	2.0000	0.5952 - 6.7201	0.2623
	FEP	28 (44.4)	24 (63.2)	0.4667	0.2044 - 1.0654	0.0704
	ATM	36 (57.1)	25 (65.8)	0.6933	0.3007 -1.5989	0.3903
	IMP	0 (0.0)	1 (2.6)	0.1969	0.0078 - 4.9565	0.3234
	MEM	28 (44.4)	5 (13.2)	5.2800	1.8223 - 15.2982	**0.0022**
	ETP*	28 (100)	6 (100)	4.3846	0.0794 - 242.1631	0.4702
	AMC	17 (27.0)	5 (13.2)	2.4391	0.8178 - 7.2750	0.1098
	TZP	0 (0.0)	1 (2.6)	0.1969	0.0078 - 4.9565	0.3234
Fenicoles	CHL	59 (93.7)	33 (86.8)	2.2348	0.5611 - 8.9021	0.2541
Macrólidos	AZT	10 (15.9)	6 (15.8)	1.0063	0.3339 - 3.0326	0.9911
Quinolonas	NAL	59 (93.7)	35 (92.1)	1.2643	0.2672 - 5.9822	0.7674
Fluoroquinolonas	CIP	49 (77.8)	29 (76.3)	1.0862	0.4180 - 2.8228	0.8652
Nitrofuranos	NIT	59 (93.7)	36 (94.7)	0.8194	0.1428 - 4.7028	0.8232
Antagonistas del folato	SXT	1 (1.6)	1 (2.6)	0.5968	0.0362 - 9.8295	0.7180

* Para KZ en planta de cosecha n = 30 y en punto de venta n = 5, además para ETP en planta de cosecha n = 28 y en punto de venta n = 6. Los números resaltados en negrita corresponden a los valores de $p<0.05$.

Los perfiles de resistencia muestran que en planta de cosecha 59 de los aislamientos, correspondiente a un 93.7% presentan resistencia a tres o más familias de antibióticos, mientas que en punto de venta 36 aislamientos de *Salmonella*, es decir un 94.7% cuenta con resistencia a tres o más familias de antibióticos, por lo que se catalogan como multirresistentes (NARMS 2019).

Un 9.9% de los aislamientos (10/104) evidenciaron resistencia a siete de las familias de antibióticos en estudio, correspondientes a aminoglucósidos, betalactámicos, fenicoles, macrólidos, quinolonas, fluoroquinolonas y nitrofuranos, de los cuales siete aislamientos fueron obtenidos en planta de cosecha. Además, uno de los aislamientos obtenidos de planta de cosecha también presentó resistencia a siete de las familias en estudio correspondientes a aminoglucósidos, betalactámicos, fenicoles, quinolonas, fluoroquinolonas, nitrofuranos y antagonistas del folato.

Un 58.4% de los aislamientos cuenta con resistencia a seis de las familias de antibióticos en estudio, 18.8% tienen resistencia a cinco familias en estudio, 5.0% a cuatro familias, 0.9% a tres familias, 0.9% a dos familias y 2.0% a una familia de antibióticos. Cabe destacar que los nitrofuranos estuvieron presentes en 16 de los 19 perfiles de resistencia determinados en la presente investigación.

Por otra parte, 5.9% de los aislamientos resultaron pansusceptibles a los 20 antibióticos en estudio, siendo punto de venta la matriz con menor porcentaje de aislamientos pansusceptibles. En alimento para aves se presentó una mayor cantidad de aislamientos susceptibles a los antibióticos en estudio, los cuales se catalogaron como pansusceptibles en su totalidad, tal y como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5.

Perfiles de resistencia de aislamientos de Salmonella enterica por familia de antibiótico, según su origen dentro de la cadena de producción avícola de Costa Rica.

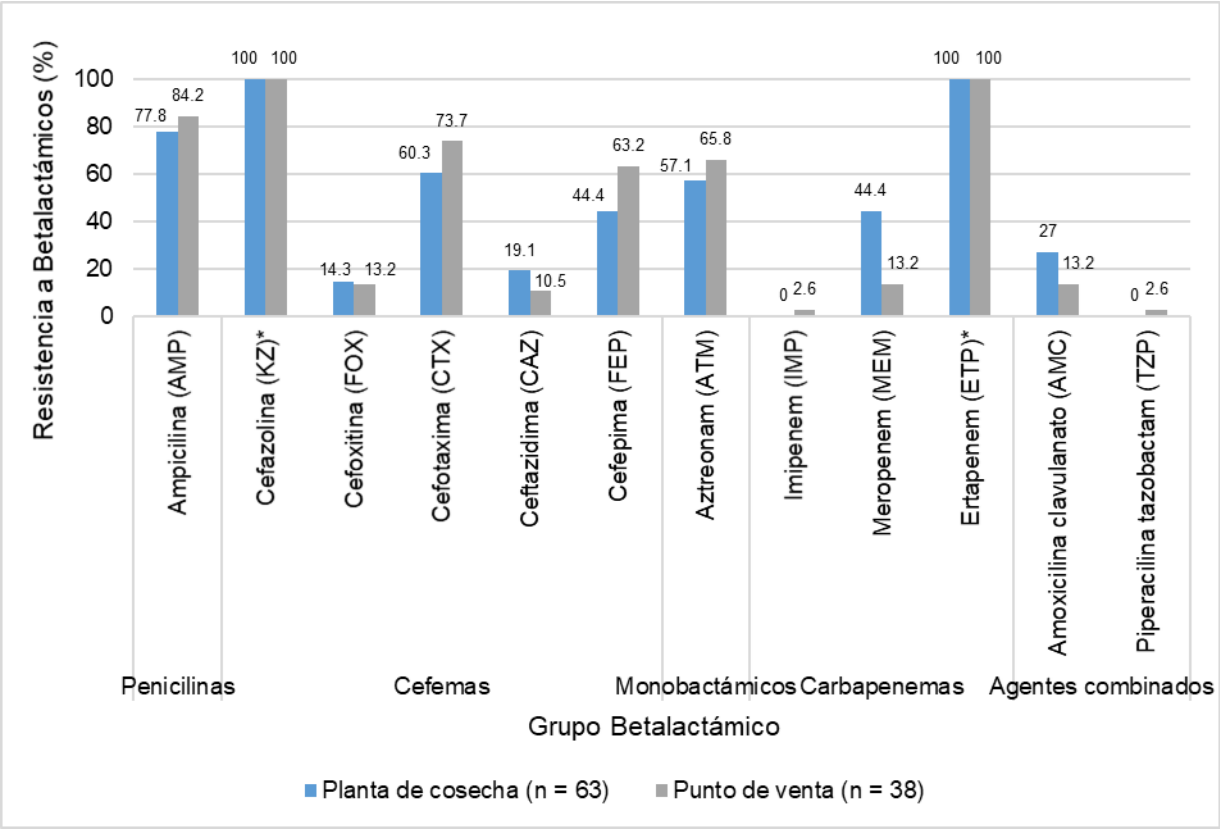
Perfil de resistencia*	Número de aislamientos (%) N = 104		
	Planta de cosecha n = 63	Punto de venta n = 38	Alimento para aves n = 3
A-B-P-M-Q-F-N	7 (11.1)	3 (7.9)	0 (0.0)
A-B-P-Q-F-N-FI	1 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
A-B-M-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
A-B-P-M-Q-N	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
A-B-P-Q-F-N	37 (58.7)	18 (47.4)	0 (0.0)
B-P-M-Q-F-N	1 (1.6)	1 (2.6)	0 (0.0)
A-B-P-Q-N	6 (9.5)	5 (13.2)	0 (0.0)
A-B-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
A-P-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
B-P-Q-F-N	3 (4.8)	1 (2.6)	0 (0.0)
A-P-M-Q-N	2 (3.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
A-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
B-P-F-FI	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
P-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
A-P-Q-N	2 (3.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
B-P-N	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
Q-N	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)
B	2 (3.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
Pansusceptible	2 (3.2)	1 (2.6)	3 (100)

* A= Aminoglucósidos, B= Betalactámicos, P= Fenicoles, M= Macrólidos, Q= Quinolonas, F= Fluoroquinolonas, N= Nitrofuranos, FI= Antagonistas del Folato.

El porcentaje de resistencia antimicrobiana más alto en la familia de los betalactámicos tanto en planta de cosecha, como en punto de venta correspondió a cefazolina y ertapenem, con un 100% para ambos antibióticos, seguido por las penicilinas, representadas en el presente estudio por el antibiótico ampicilina con 77.8% en planta de cosecha y 84.2% en punto de venta. Las cefemas también presentaron altos niveles de resistencia que en el caso específico de cefotaxima correspondió a un 60.3% en planta de cosecha y un 73.7% en punto de venta.

No se determinó resistencia a nivel de planta de cosecha para imipenem y piperacilina tazobactam. Por su parte en punto de venta se determinó un 2.6% de resistencia en ambos antibióticos.

En seis de los antibióticos betalactámicos analizados se determinó un mayor porcentaje de resistencia en planta de cosecha si se compara con punto de venta, tal y como se muestra en la Figura 1.



* Para KZ en planta de cosecha n = 30 y en punto de venta n = 5, además para ETP en planta de cosecha n = 28 y en punto de venta n = 6.

Figura 1.

Resistencia a Betalactámicos en aislamientos de Salmonella enterica, según grupo y origen.

3.2 Determinación de la presencia del gen *bla*$_{CMY-2}$ por PCR convencional

En la Figura 2 se puede visualizar la amplificación del gen *bla*$_{CMY-2}$ a 122 pares de bases, en la cepa de *Salmonella Typhimurium* (OPS-216), brindada por el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología del INCIENSA, que corresponde al control positivo en la presente investigación, utilizando electroforesis capilar, por medio del instrumento QIAxcel Advanced (Qiagen, Germany, 2016).

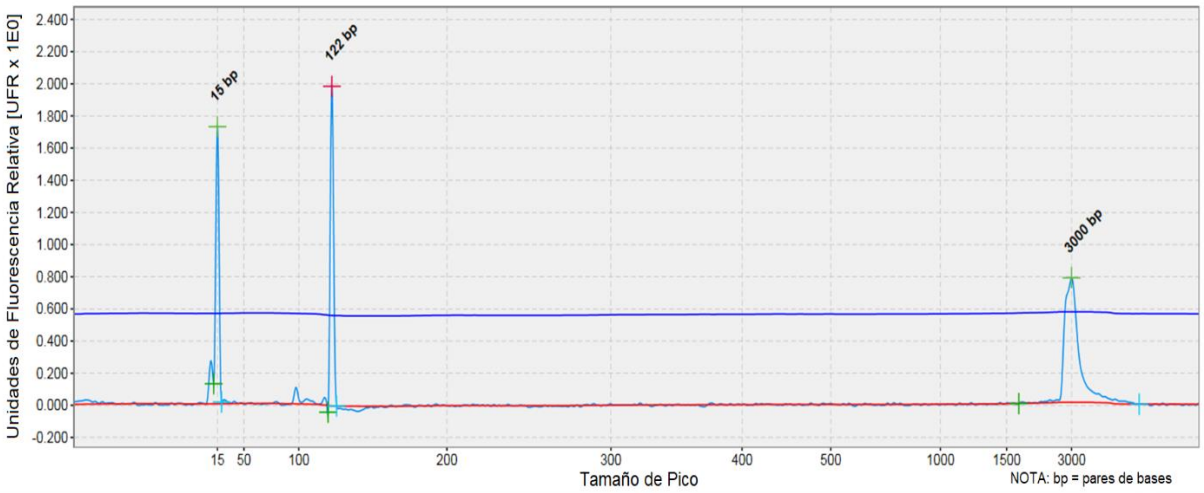


Figura 2.

Visualización de PCR para determinación de la presencia del gen bla$_{CMY-2}$ *por medio de electroforesis capilar, utilizando el instrumento QIAxcel Advanced.*

3.3 Resultados obtenidos como parte del proyecto inscrito bajo el código B-9252 de la UCR, realizado de forma paralela a la presente investigación

3.3.1 Comparación de resultados fenotípicos y genotípicos

Al comparar los resultados mediante la prueba exacta de Fisher obtenidos fenotípicamente con el método de Kirby-Bauer con los obtenidos genotípicamente por medio de secuenciación de genoma completo no se muestran diferencias significativas ($p<0.05$) para la familia de fenicoles; sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas para las familias de aminoglucósidos, betalactámicos y antagonistas del folato, tal y como se observa en el Cuadro 6.

Cuadro 6.

Comparación entre la caracterización fenotípica y genotípica de 71 aislamientos de Salmonella enterica recuperados en tres puntos de la cadena avícola de Costa Rica.

Familia de antibiótico	Número de aislamientos (%) N = 71		OR	IC 95%	Valor *p* *
	Fenotipo	Genotipo			
Aminoglucósidos	61 (85.9)	71 (100)	0.0410	0.0024 - 0.7134	**0.0284**
Betalactámicos	64 (90.1)	48 (67.6)	4.3810	1.7369 - 11.0497	**0.0017**
Fenicoles	64 (90.1)	61 (85.9)	1.4988	0.5364 - 4.1883	0.4402
Antagonistas del folato	1 (1.4)	61 (85.9)	0.0023	0.0003 - 0.0188	**<0.0001**

* Los números resaltados en negrita corresponden a los valores de $p<0.05$.

3.3.2 Determinación de los serovares de *Salmonella enterica* por secuenciación de genoma completo y análisis con SISTR versión 1.1.1

Al analizar los 71 aislamientos elegidos para la secuenciación de genoma completo se determinó la presencia del serovar Kentucky, correspondiente al 2.8%, además del serovar Anatum con un 2.8% y el serovar Infantis en mayor cantidad con un 94.4%.

Se estableció que el serovar Anatum únicamente presentaba resistencia a la familia de los betalactámicos, mientras que uno de los aislamientos del serovar Kentucky resultó pansusceptible. Para el serovar Infantis únicamente un aislamiento presenta resistencia a menos de tres familias de antibióticos distintas, mientras que siete de los aislamientos de *S.* Infantis presentaron resistencia a siete de las familias de antibióticos en estudio, de los cuales cuatro provenían de planta de cosecha y tres de punto de venta, tal y como se muestra en el Cuadro 7.

Cuadro 7.

Distribución de los perfiles de resistencia (n, %) utilizando el método de Kirby-Bauer, en *Salmonella enterica por serovar, según su origen, en un total de 71 aislamientos.*

Serovar	**Perfil de resistencia***	**Número de aislamientos (%) N=71**	
		Planta de cosecha n=34	**Punto de venta n=37**
Kentucky	B-P-F-FI	0 (0.0)	1 (2.7)
	Pansusceptible	0 (0.0)	1 (2.7)
Anatum	B	2 (5.9)	0 (0.0)
Infantis	A-B-P-M-Q-F-N	4 (11.8)	3 (8.1)
	A-B-M-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	A-B-P-M-Q-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	A-B-P-Q-F-N	22 (64.7)	17 (45.9)
	B-P-M-Q-F-N	1 (2.9)	1 (2.7)
	A-B-P-Q-N	3 (8.8)	5 (13.5)
	A-B-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	A-P-M-Q-N	2 (5.9)	0 (0.0)
	A-P-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	B-P-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	A-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	P-Q-F-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	B-P-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	Q-N	0 (0.0)	1 (2.7)
	Total	34 (100)	37 (100)

* A= Aminoglucósido, F= Fluoroquinolonas, B= Betalactámicos, M= Macrólidos, Q= Quinolonas, N= Nitrofuranos, P= Fenicoles.

3.4 Determinación de la presencia de los genes *bla*$_{CMY-2}$ y *bla*$_{CTX-M}$ y otros genes de resistencia por secuenciación de genoma completo y análisis con ResFinder versión 4.0

El gen *bla*$_{CTX-M-65}$, asociado con resistencia a los betalactámicos fue encontrado en un 67.6%. También se encontraron genes de resistencia a los aminoglucósidos como *aac(3)-IVa_1* en un 85.9%, *ant(3'')-Ia_1* en el 91.6%, *aph(3')-IIa_2* en apenas un 1.4%, *aph(3')-Ia_7* en 2.8%, *aph(3')-Ia_9* en 1.4%, *aph(4)-Ia_1* en 88.7%, *aph(6)-Id_1* en un 2.8%, *strA_1* en el 1.4% y *aac(6')-Iaa_1* presente en 100% de los aislamientos.

Otro gen encontrado fue *floR_2*, asociado a resistencia al cloranfenicol, el cual estuvo en un 85.9% de los aislamientos analizados. Además, se detectó el gen *fosA3_1* en un 35.2%, el cual se relaciona con resistencia a la fosfomicina y el gen *sul1_5* en un 85.9% de los aislamientos, el cual se asocia con resistencia a las sulfonamidas.

Finalmente, se detectaron genes de resistencia a las tetraciclinas, los cuales corresponden a *tet(A)_4* en el 1.4% de los aislamientos y el *tet(B)_2* en igual porcentaje, además se encontró el *tet(A)_6* en un 84.5%, siendo el gen mayormente representado para la familia de las tetraciclinas en el presente estudio, tal y como se muestra en la Figura 3.

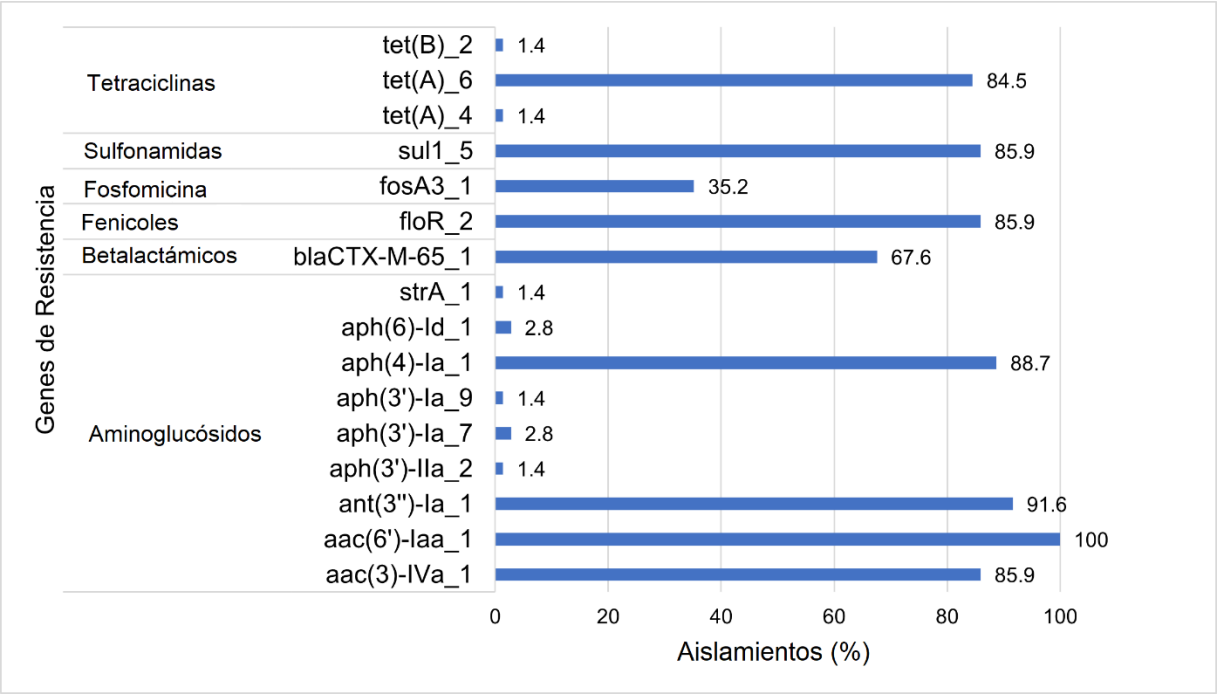


Figura 3.

Frecuencia en la presentación de genes de resistencia por familia de antibióticos detectados en aislamientos de Salmonella enterica con el software ResFinder versión 4.0.

El serovar Infantis presentó genes de resistencia para seis familias de antibióticos, correspondientes a aminoglucósidos, tetraciclinas, antagonistas del folato, betalactámicos, fenicoles y fosfomicinas, siendo *aac(6')-Iaa_1 y ant(3")-Ia_1* los genes más representados, con un 100% y 97.0%, respectivamente, ambos de la familia aminoglucósidos.

El 100% de los aislamientos de serovar Kentucky presentó genes *aac(6')-Iaa_1* y *aph(6)-Id_1* de la familia de los aminoglucósidos, mientras que 50.0% contaba con *tet(B)_2* de la familia tetraciclinas. Por su parte, el serovar Anatum presentó

únicamente el gen asociado con aminoglucósidos *aac(6')-Iaa_1* en un 100%, tal y como se evidencia en el Cuadro 8.

Cuadro 8.

Distribución porcentual de genes de resistencia encontrados con el software ResFinder versión 4.0, en Salmonella enterica, según serovar, en un total de 71 aislamientos.

Familia	**Serovares de *Salmonella enterica* N = 71**					
	Infantis n = 67		**Kentucky n = 2**		**Anatum n = 2**	
	Gen	%	Gen	%	Gen	%
Aminoglucósidos	*aac(3)-IVa_1* *aac(6')-Iaa_1* *ant(3'')-Ia_1* *aph(3')-IIa_2* *aph(3')-Ia_7* *aph(3')-Ia_9* *aph(4)-Ia_1*	91.0 100 97.0 1.5 3.0 1.5 94.0	*aac(6')-Iaa_1* *aph(6)-Id_1* *strA_1*	100 100 50.0	*aac(6')-Iaa_1*	100
Tetraciclinas	*tet(A)_4* *tet(A)_6*	1.5 89.6	*tet(B)_2*	50.0		0.0
Antagonistas del folato	*sul1_5*	91.0		0.0		0.0
Betalactámicos	$bla_{\text{CTX-M-65_1}}$	71.6		0.0		0.0
Fenicoles	*floR_2*	91.0		0.0		0.0
Fosfomicinas	*fosA3_1*	37.3		0.0		0.0

4 DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer

4.1.1 Aminoglucósidos

La efectividad de los aminoglucósidos ante *Salmonella enterica* fue evaluada en la presente investigación por medio de amikacina y gentamicina. Se obtuvo como resultado 100% de susceptibilidad para amikacina en aislamientos provenientes de punto de venta y alimento para aves; sin embargo, se contó con apenas un n = 3 en alimento para aves. Por su parte, en planta de cosecha se determinó un pequeño porcentaje de resistencia correspondiente al 3.2%.

Esta familia es utilizada en medicina desde 1940, pero su actividad se ha visto afectada por enzimas como fosfotransferasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas; por lo que en 1970 se inició con el desarrollo de aminoglucósidos semisintéticos como amikacina (Ramírez y Tolmasky 2017).

El uso de amikacina en medicina humana se dirige a infecciones sistémicas graves, aunque, se suele limitar su uso debido a las complicaciones por nefrotoxicidad que puede tener en los pacientes tratados (Jenkins et al. 2016). En medicina veterinaria por su parte se ha utilizado en animales de producción como lo son las cabras para tratar infecciones por bacterias gran negativas (Errecalde et al. 2000). Actualmente su uso en Costa Rica se limita a tratamientos en seres humanos, ya que su venta para fines de medicina veterinaria no está aprobada (Medivet 2021).

Por su parte, gentamicina presentó altos porcentajes de resistencia en el presente estudio, correspondientes a 92.1% en planta de cosecha y 81.6% en punto de venta. Algunos mecanismos que pueden provocar resistencia a gentamicina, además de la producción de enzimas, corresponden a cambios en el punto blanco de la bacteria donde actúa el fármaco, en la subunidad ribosómica 30S, se da metilación en el sitio de unión de la molécula y cambios en la permeabilidad de la membrana, de manera que se limita el ingreso a la bacteria (Hayward et al. 2018).

Un estudio llevado a cabo en Costa Rica en el año 2012 a nivel de planta de proceso avícola determinó que cepas de *Salmonella* aisladas de canales de pollo contaban con 100% de susceptibilidad a gentamicina (Rivera 2012), difiriendo en gran medida con los resultados reportados en la presente investigación.

El uso veterinario de gentamicina en la industria avícola de Costa Rica es permitido actualmente, principalmente a nivel de pequeños productores, no a nivel de la industria. Por otro lado, a partir del año 2020 se incluyó por parte del SENASA el monitoreo de residuos de aminoglucósidos en alimentos de origen animal, siendo el residuo que se encontró en menor cantidad (SENASA 2020c; Medivet 2021).

4.1.2 Betalactámicos

La familia de los betalactámicos estuvo representada en esta investigación por 12 antibióticos, pertenecientes a distintos grupos, incluyendo las penicilinas como la ampicilina, cefemas, que correspondieron a cafazolina, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y cefepima, por otro lado, monobactámicos como el aztreonam,

carbapenemas como el imipenem, meropenem y ertapenem y finalmente agentes combinados como la amoxicilina clavulanato y piperacilina tazobactam.

Las penicilinas en medicina veterinaria se suelen utilizar principalmente en el tratamiento de infecciones urinarias en pequeñas especies. También es común su uso en casos de mastitis en bovinos (USDA 2014, Medivet 2021). En aves está indicado su uso en el tratamiento de infecciones respiratorias (Kepro 2022).

Según el informe de vigilancia basada en laboratorio de *Salmonella* de INCIENSA para el año 2013 se presentó un 1.5% de resistencia a ampicilina en aislamientos de origen humano, mientras que para el 2020 se determinó una resistencia del 9.7% (INCIENSA 2013a, INCIENSA 2020). En la presente investigación se encontró un 84.2% de resistencia en punto de venta y 77.8% en planta de cosecha, lo cual es realmente un serio problema para la salud pública tomando en cuenta que se trata de un antibiótico utilizado para el tratamiento médico de salmonelosis en seres humanos (Ibarra et al. 2005).

Con respecto a las cefalosporinas de tercera generación algunas como la cefotaxima son utilizadas en medicina veterinaria para el tratamiento de salmonelosis en cerdos (Biochem 2022). Además, son de uso clínico para salmonelosis en seres humanos, según INCIENSA en el año 2013, se reportó en bacterias del género *Salmonella* de origen no humano 100% de susceptibilidad a cefotaxima y ceftazidima (INCIENSA 2013a). En la presente investigación se detectó un 73.7% de resistencia a cefotaxima en punto de venta y un 60.3% en planta de proceso, además de un 10.5% de resistencia a ceftazidima en punto de venta y 19.1% en planta de proceso, encontrándose diferencia entre ambos estudios. Cabe destacar que en el reporte dado

por INCIENSA sobre la situación de Costa Rica con respecto a *Salmonella enterica* en el 2013 no especifica para el análisis de resistencia en los aislamientos de origen no humano cuáles correspondían a los que se obtuvieron de origen avícola, ya que se contaba también con aislamientos de origen bovino, porcino, pescado, mariscos, vegetales, ambiente y alimentos balanceados. Además, la prueba de susceptibilidad a los antibióticos aplicado por INCIENSA fue únicamente a 36 de los 112 aislamientos con los que contaban, mientras que en el presente estudio se aplicó el análisis de susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer a 104 aislamientos.

Para el año 2020 INCIENSA reportó que un 8.5% de las bacterias de *Salmonella* de origen humano presentaban resistencia a las cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima y/o ceftazidima, siendo en su mayoría del serovar Infantis (INCIENSA 2020), de manera que se muestra un aumento en comparación con el informe del año 2013.

Por otra parte, en el año 2017 se reportó en Japón la presencia de cepas de *Salmonella* no tifoidal resistente a cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima en heces de personas encargadas de manipular alimentos, lo cual representa una amenaza para la salud pública y evidencia que la problemática sobre la resistencia en bacterias del género *Salmonella* es un tema global (Saito et al. 2017).

En otras cefemas como cefazolina se encontró un 100% de resistencia tanto en punto de venta, como en planta de cosecha, además en cefoxitina se encontró 13.2% de resistencia en punto de venta y 14.3% en planta de cosecha, mientras que en cefepima un 63.2% en punto de venta y 44.4% en planta de cosecha. Por su parte, un estudio realizado en Colombia con aislamientos de *Salmonella* obtenidos de carne de

pollo en punto de venta también reportó resistencia a cefazolina, cefoxitina y cefepima en diferentes grados, en los serovares Paratyphi, Heidelberg, Enteritidis, Typhimurium y otros serovares no especificados (Donado et al. 2014).

Por otro lado, aztreonam del grupo de monobactámicos, tuvo un 65.8% de resistencia en punto de venta y 57.1% en planta de cosecha. Existen reportes de su uso en pacientes con fiebre tifoidea, que es provocada por *Salmonella* Typhi (Carrada 2007). Sin embargo, en la actualidad no es un antibiótico comúnmente utilizado en estos casos.

Según el informe de vigilancia de *Salmonella* del INCIENSA para el año 2020 no se reportó resistencia en ninguno de los aislamientos de origen humano para carbapenemas, siendo analizados meropenem e imipenem (INCIENSA 2020). Por su parte en la presente investigación tampoco se encontró resistencia a imipenem en planta de cosecha, pero en punto de venta se determinó un 2.6%. Para meropenem 13.2% de los aislamientos de punto de venta fueron resistentes y 44.4% en planta de cosecha.

En ertapenem se determinó un 100% de resistencia en punto de venta y planta de cosecha. Se ha reportado que la resistencia en enterobacterias a las carbapenemas puede ocurrir por adquisición de genes que codifican para carbapenemasas tipo KPC, además de BLEEs (Maldonado et al. 2017).

Con respecto a los agentes combinados se encontró 13.2% de resistencia a amoxicilina con ácido clavulánico en punto de venta y 27.0% en planta de cosecha, para piperacilina tazobactam tazobactam un 2.6% en punto de venta y en planta de cosecha no hubo aislamientos resistentes. Para el año 2013 INCIENSA reportó un

1.5% de resistencia a piperacilina tazobactam (INCIENSA 2013a). Por su parte un estudio reporta resistencia a amoxicilina con ácido clavulánico y a piperacilina tazobactam, en los serovares de *Salmonella* Paratyphi, Heidelberg Enteritidis y Typhimurium, proveniente de carne de pollo (Donado et al. 2014).

4.1.3 Fenicoles

La familia de los fenicoles estuvo representada en el presente estudio por cloranfenicol. La literatura reporta que se pueden dar dos efectos de toxicidad en seres humanos relacionados a este antibiótico, uno dependerá de la dosis, presentándose durante tratamientos médicos por medio de los cuales se puede inducir una depresión medular. El otro efecto es independiente de la dosis, en este caso se presenta anemia aplásica y una vez que aparece no es reversible (FAO 2004).

El monitoreo de residuos en alimentos de origen animal de SENASA cuenta con una vigilancia particular para el cloranfenicol, debido a que sus efectos adversos pueden aparecer aún con niveles trazas que lleguen a personas susceptibles, razón por la cual no se permite su uso en especies de producción en Costa Rica. Según los resultados del monitoreo efectuado en el 2020 no se encontraron residuos de cloranfenicol en alimentos de origen animal destinados al consumo humano (SENASA 2020c).

En la presente investigación se obtuvo un 93.7% de resistencia al cloranfenicol en planta de cosecha y 86.8% en punto de venta. Estos resultados difieren en gran medida con los reportados en planta de cosecha para aves en Costa Rica por Rivera en el año 2012, donde se encontró un 8% de resistencia al cloranfenicol (Rivera 2012).

Por su parte INCIENSA reportó en 2013 que un 1.5% de aislamientos de *Salmonella* obtenidos de seres humanos contaban con resistencia al cloranfenicol y pertenecían al serovar Typhimurium (INCIENSA 2013a). De manera que se encontraron resultados considerablemente más altos en la presente investigación en planta de cosecha y punto de venta.

Uno de los mecanismos por los cuales se puede presentar resistencia al cloranfenicol en enterobacterias es la inactivación de la molécula por medio de enzimas codificadas por genes que pueden estar tanto en plásmidos, como en el genoma bacteriano y se asocian a transposones o integrones (Farfán et al. 2002), esto se evidenció en la presente investigación por medio del gen *floR_2*.

La problemática entorno al cloranfenicol es preocupante en otros países de Latinoamérica como Venezuela, donde a pesar de estar prohibido su uso en animales destinados al consumo humano, se detectaron residuos en cerdos, correspondiente a un 17% de las muestras analizadas, los niveles oscilaban entre los 13.6 ng/Kg y 42.9 ng/Kg (Briceño et al. 2010). Cabe destacar que los niveles de resistencia encontrados en la presente investigación son altos, a pesar de ser un antibiótico que no está aprobado para uso en aves de engorde y, además, no se presentan residuos según el último reporte nacional brindado por SENASA. Se debe mencionar que dichos efectos no están presentes en otros fenicoles (SENASA 2020c). El uso en Costa Rica sólo está permitido en medicina veterinaria para otras especies que no estén destinadas al consumo humano tales como animales de compañía (Medivet 2021).

4.1.4 Macrólidos

Los macrólidos se estudiaron en la presente investigación por medio de azitromicina. Este antibiótico se ha utilizado en seres humanos para infecciones entéricas, genitourinarias y respiratorias, estando actualmente en estudio su uso en pacientes con covid-19, ya que existen informes de que puede tener propiedades antivirales al combinarlo con hidroxicloroquina. Sin embargo, aún se realizan estudios para determinar su efectividad en este contexto (Damle et al. 2020). Se ha reportado efectividad in vitro de este antibiótico ante *Salmonella*, pero no clínicamente (Gómez 2017). En medicina veterinaria su uso se da principalmente en infecciones bucales en especies menores, además en aves se utiliza para el tratamiento de infecciones respiratorias y reproductivas (Medivet 2021; JB 2022).

Para el año 2017 el Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana de los Estados Unidos reportó un 1% de disminución de la susceptibilidad a la azitromicina en aislamientos de *Salmonella* no tifoidea, recuperados de casos clínicos humanos (CDC 2019a). En esta investigación se obtuvo un resultado mayor en planta de cosecha y punto de venta, correspondiente a 15.9% y 15.8% respectivamente.

La resistencia ante azitromicina se puede dar por una alteración en el punto blanco que tenga en la bacteria mediante metilasas codificadas por genes *erm*, modificación de la molécula propiamente y bombas de eflujo, que en *Streptococcus* suele estar mediado por genes *mef* (AEMPS 2018). Actualmente en Costa Rica los macrólidos se encuentran entre las familias incluidas en el monitoreo del plan nacional

de residuos, además la molécula cuenta con permiso sanitario para uso en medicina veterinaria en el país (SENASA 2020c; Medivet 2021).

4.1.5 Quinolonas

La familia de las quinolonas estuvo representada en el presente estudio por el ácido nalidíxico. El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en inhibir a las topoisomerasas, que son indispensables para que ocurra la síntesis de ADN, por lo que se inhibe la reproducción de la bacteria. Se utilizan para tratar infecciones urinarias, respiratorias, e incluso septicemias en seres humanos (Alós 2003).

En medicina aviar tiene acción sinérgica al combinarse con aminoglucósidos como la gentamicina siendo efectivo en el tratamiento de infecciones respiratorias, digestivas e incluso urinarias, dada su buena distribución a estos tejidos. También es utilizado con los mismos fines terapéuticos en cerdos (Avimex 2022).

Según un estudio en terneros destinados al consumo humano en Costa Rica se obtuvo un 3.4% de resistencia al ácido nalidíxico (Ismael-Acle 2020), mientras que en el presente estudio se obtuvo 93.7% en planta de cosecha y 92.1% en punto de venta, por lo que los resultados son considerablemente más altos en pollos de engorde.

El monitoreo de este antibiótico por parte de INCIENSA se hace como marcador de vigilancia, mostrando según el reporte del 2013 de vigilancia basada en el laboratorio para *Salmonella* de origen humano un 6% de resistencia al ácido nalidíxico, resultado que también difiere con los datos de la presente investigación (INCIENSA 2013a). Por otra parte, el último reporte de INCIENSA para *Salmonella* de origen

humano, determinó que existía resistencia mayormente en el serovar Infantis, seguido de los serovares Enteritidis y Panama (INCIENSA 2020).

La resistencia al ácido nalidíxico suele ser mediada por la mutación del gen *gyrA* (Ruiz et al. 2004). En las enterobacterias como *Escherichia coli* el *gyrA* codifica para la ADN girasa y se ubica en la zona llamada región determinantes de resistencia a quinolonas, el codón que se ve más frecuentemente afectado es el 83, seguido del 87, una sola mutación tiene como consecuencia una disminución de la susceptibilidad, pero dos mutaciones provocan resistencia a las quinolonas (De la Fuente et al. 2007).

4.1.6 Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas se estudiaron en la presente investigación por medio de ciprofloxacina, dada su importancia en el uso clínico ante salmonelosis en seres humanos al igual que las cefalosporinas de tercera generación y trimetoprima sulfametoxazol (Ibarra et al. 2005; INCIENSA 2020). Las fluoroquinolonas ampliaron el espectro de las quinolonas por medio de la adición de un átomo de flúor en la posición del carbono 6. Hasta hace poco se consideraba que tenían buena acción ante bacilos gran negativos. Sin embargo, su resistencia ha ido en aumento en bacterias del género *Salmonella* (Alós 2003; De la Fuente 2007). A nivel nacional en Costa Rica son ampliamente utilizadas otras fluoroquinolonas de amplio espectro como la enrofloxacina, tanto en especies menores como en especies productivas, incluidas las aves (Medivet 2021).

Estados Unidos por medio del Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana reportó en el 2017 que aislamientos de *Salmonella* no tifoidea,

recuperados de casos clínicos humanos presentaron un aumento del 8% de resistencia a ciprofloxacina (CDC 2019a). A nivel nacional un estudio realizado en el año 2012 en una planta procesadora comercial de pollo en Costa Rica determinó que cepas de *Salmonella* aisladas de canales de pollo presentaban 100% de susceptibilidad a ciprofloxacina, difiriendo con los resultados del presente estudio donde se encontró un 77.8% en planta de cosecha y 76.3% en punto de venta, indicando un aumento desde la realización de la investigación de Rivera en el 2012 a nivel de la cadena de producción avícola de Costa Rica.

Por su parte, el reporte dado por INCIENSA en el informe de vigilancia basada en laboratorio de *Salmonella* indica que para el año 2013 los aislamientos de origen no humano presentaban un 50% de susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina y un 2.7% de resistencia, mientras que aquellos de origen humano tenían 100% de susceptibilidad (INCIENSA 2013a). Para el año 2020 INCIENSA reporta que en aislamientos de *Salmonella* de origen humano se presenta 7.7% de resistencia intermedia, los cuales correspondían a los serovares Typhimurium, Enteritidis, Panama, Infantis, Branderup y Oranienburg (INCIENSA 2020).

Un estudio realizado en Costa Rica en terneros destinados a consumo humano reporta un 64.9% de resistencia a ciprofloxacina, siendo este porcentaje cercano al encontrado en la presente investigación en pollos de engorde (Ismael-Acle 2020). Es importante mencionar que el uso veterinario de ciprofloxacina está permitido en el sector avícola de Costa Rica (Medivet 2021).

La resistencia a fluoroquinolonas se puede dar por varias vías, tales como alteraciones en el punto blanco de la bacteria donde actúa el fármaco, disminución de

la concentración intracelular del antibiótico y por medio de plásmidos que cuentan con genes que le confieren resistencia. Entre los mecanismos plasmídicos de resistencia más conocidos se encuentra la expresión del gen *qnr*, siendo más comunes los *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* (De la Fuente 2007; Doma et al. 2020). Estos genes actúan protegiendo a la ADN girasa de la inhibición por parte de las fluoroquinolonas (Wu et al 2007).

4.1.7 Nitrofuranos

La actividad de los nitrofuranos ante *Salmonella enterica* se estudió en la presente investigación utilizando nitrofurantoína. Debido a la problemática que gira en torno al uso de nitrofurantoína la Unión Europea prohibió su uso en animales de producción desde el año 1995, ya que se consideró que sus residuos en carne podían producir carcinogenicidad en seres humanos, principalmente en relación con el metabolito semicarbazida (Vass et al. 2008).

En algunos países de Latinoamérica, como es el caso de Perú se ha utilizado indiscriminadamente la nitrofurantoína en animales de producción como promotor de crecimiento, prohibiéndose su uso en medicina veterinaria en el año 2013, debido al alto riesgo de residuos que pueden encontrarse en animales para consumo humanos que fueron tratados con este fármaco (Martínez et al. 2020).

En el caso de Costa Rica actualmente no está permitido su uso veterinario (Medivet 2021). Sin embargo, es un fármaco que suele ser utilizado para tratar infecciones del tracto urinario en seres humanos, generalmente provocados por las enterobacterias *Escherichia coli, Klebsiella neumoniae* y *Proteus mirabilis,* en las cuales se reporta tener mejor actividad que otros fármacos que se utilizaban de

primera línea anteriormente como lo era trimetoprima sulfametoxazol (Jiménez et al. 2017).

Un estudio llevado a cabo en el sector de producción pecuaria en Costa Rica en el año 2020, con aislamientos de *Salmonella* obtenidos de vacas postparto reportó resistencia a la familia de los nitrofuranos en un 27.77% (Huertas 2020). Por el contrario, en la presente investigación se reporta un 94.7% en punto de venta y un 93.7% en planta de proceso de origen aviar, existiendo un mayor grado de resistencia en pollos de engorde si se comparan con vacas postparto, a pesar de ser estudios contemporáneos en diferentes especies productivas.

Por otra parte, los datos reportados en una investigación llevada a cabo en terneros destinados a consumo humano determinan un 76.27% de resistencia nitrofurantoína, dicho resultado se asemeja a los obtenidos en el presente estudio, no obstante, continúa siendo numéricamente mayor el porcentaje encontrado en pollos de engorde (Ismael-Acle 2020).

El último reporte dado por INCIENSA sobre vigilancia de *Salmonella* determina un 1.6% de resistencia a la nitrofurantoína en aislamientos de origen humano, correspondientes a los serovares Infantis y Panama (INCIENSA 2020). Estos resultados también difieren con los encontrados en el presente estudio.

4.1.8 Antagonistas del folato

Los antagonistas del folato fueron representados en la presente investigación por trimetoprima sulfametoxazol, dada su importancia en el tratamiento de salmonelosis en seres humanos, especies menores como perros y gatos y especies

productivas como cerdos, además, se encuentra aprobado su uso veterinario en especies menores y animales destinados a consumo humano en Costa Rica (INCIENSA 2020; Medivet 2021). Algunas presentaciones en combinación con bromhexina son utilizadas para el tratamiento de enfermedades respiratorias en aves (Farbio 2021).

Las sulfonamidas fueron uno de los primeros antibióticos en ser utilizados en la medicina, alrededor de 1930, 30 años después apareció el antibiótico sintético trimetoprima, que complementaba a las sulfonamidas para aumentar su efectividad, de manera que las sulfonamidas inhiben la dihidropteroato sintetasa que cataliza la formación de dihidrofolato, mientras que el trimetoprima inhibe la dihidrofolato reductasa, que permite la formación de tetrahidrofolato a partir de dihidrofolato (Huovinen 2001).

En Costa Rica para el año 2012 se encontró en planta de procesamiento de aves un 92% de resistencia a trimetoprima sulfametoxazol (Rivera 2012). Mientras que, en terneros destinados al consumo humano se encontró en el año 2020 un 27.68% de resistencia a este antibiótico (Ismael-Acle 2020). Ambos resultados difieren de la presente investigación, donde se obtuvo 1.6% de resistencia en planta de cosecha y 2.6% en punto de venta.

Por otro lado, INCIENSA reporta que para el año 2013 un 0.5% de resistencia en aislamientos de *Salmonella* Berta obtenidos de origen humano, mientras que en aislamientos de *Salmonella* Gallinarum de origen no humano se obtuvo un 2.7% de resistencia (INCIENSA 2013a). Sin embargo, en su informe más reciente se determinó

un 3.2% de resistencia en aislamientos de origen humano, correspondientes a *Salmonella* Infantis (INCIENSA 2020).

Para el año 2006 un estudio realizado en Colombia reportó que bacterias del género *Salmonella* aisladas de aves ponedoras presentaban 100% de susceptibilidad a trimetoprima sulfametoxazol, lo cual no difiere en gran medida de los resultados encontrados en la presente investigación, donde se obtuvo 98.4% de susceptibilidad en planta de cosecha y 97.4% en punto de venta (Ruiz et al. 2006).

La resistencia a trimetoprima sulfametoxazol se puede dar por varios mecanismos, uno de ellos es por medio de bombas de eflujo, que disminuyen la concentración intracelular del fármaco, otra es mediante mutaciones en genes *dhps*, como el *folP*. El folP codifica la dihidropteroato sintasa, la enzima diana de las sulfonamidas, la cual al estar mutada no puede ser localizada por trimetoprima sulfametoxazol, lo que evita la acción de este antibiótico sobre la bacteria (Huovinen 2001; Buwenbo et al. 2013). En enterobacterias como *Escherichia coli* se ha reportado este mecanismo de resistencia, asociado a la presencia de los genes *sulf1* y *sulf2* que afectan al sulfametoxazol y el gen *dfr* que afecta al trimetoprima (Mosquito et al. 2011).

4.1.9 Alimento para aves

Para que ocurra crecimiento de *Salmonella* en una matriz deben unirse una serie de factores que le sean favorables, uno de ellos es el a_w, cuyo valor óptimo para esta bacteria corresponde a 0.99. Los valores de a_w cercanos a 1 se consideran más perecederos que aquellos cercanos a 0, es decir que alimentos con a_w altos brindan un mejor ambiente para el crecimiento de bacterias (King et al. 2011; FDA 2014).

Los alimentos balanceados que se ofrecen a los animales destinados al consumo humano son producidos y almacenados en condiciones de baja humedad, ya que la presencia de agua en los mismos los vuelve más vulnerables a la contaminación por microorganismos (FAO 2010). Lo anterior justifica la poca prevalencia obtenida en el estudio *"Análisis de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entericas aisladas en diferentes puntos de la cadena de producción avícola nacional"* inscrito bajo el código B-9252 de la UCR, donde se analizaron 100 muestras de alimento balanceado para aves obteniendo una prevalencia de *Salmonella enterica* del 3%, siendo estos aislamientos utilizados en el presente estudio de resistencia antimicrobiana, representando una cantidad poco significativa.

Datos obtenidos como parte de un programa de vigilancia en alimentos para animales de Costa Rica entre el año 2009 y 2014, donde se analizaron un total de 1725 muestras, revelaron una prevalencia de *Salmonella* del 6.38%, un 69.1% de estos aislamientos correspondían a alimento para aves, superando a la harina de carne y huesos, alimentos para mascotas y otros alimentos (Molina 2016), estos resultados no difieren en gran medida con los obtenidos en el estudio B-9252 de la UCR, por lo que se puede confirmar que la prevalencia de *Salmonella* en este tipo de matrices es considerablemente baja.

Por otra parte, los antibióticos al ingresar en el organismo se encargan de atacar a las bacterias más vulnerables e indirectamente seleccionan a las más fuertes, las cuales pueden ser susceptibles, pero suelen requerir mayor tiempo de interacción con el fármaco, si lo anterior no se cumple ocurre la resistencia antimicrobiana, ya que las mismas logran sobrevivir a la terapia y se reproducen posteriormente (Errecalde 2004).

Dicha exposición a fármacos no ocurre en el alimento para aves, por lo que no se da la selección de bacterias y tampoco se da un ambiente desafiante que obligue a las bacterias de *Salmonella* a adquirir genes de resistencia o en caso de que ya los tenga en su genoma, expresarlos.

Una vez que *Salmonella* infecta a las aves de engorde cambia por completo el ambiente y necesita adaptarse para lograr sobrevivir. Este enteropatógeno tiene la capacidad de producir en la mayoría de los casos infecciones subclínicas, de modo que los productores no lo perciben como un peligro para su sistema productivo (SENASA 2020a). Cuando se inicia con el suministro de antibióticos en los pollos de engorde a tempranas edades las bacterias se irán seleccionando, de manera que sobrevivan las más fuertes. Esto se evidencia con los resultados expuestos en el Cuadro 5, ya que las aves llegan a planta de cosecha portando bacterias del género *Salmonella* que presentan perfiles de resistencia para un considerable número de familias de antimicrobianos, lo que quiere decir que la bacteria está expresando genes que le permitan adaptarse a las condiciones que se le ofrecen en el ambiente.

Con respecto al análisis estadístico en la determinación de susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer, se encontró un único resultado con diferencia significativa ($p<0.05$), correspondiente a meropenem, entre las matrices punto de venta y planta de cosecha, determinándose mayor resistencia en planta de cosecha.

4.1.10 Perfiles fenotípicos de resistencia

Los perfiles fenotípicos de resistencia por familia muestran información relevante de la situación de algunos sectores de Costa Rica con respecto a la carne de pollo, ya que se encontró un 91.3% de aislamientos de *Salmonella* con resistencia tres o más familias de antibióticos, lo que se cataloga como multirresistencia (NARMS 2019). Al analizarlo por matrices se determinó un porcentaje mayor en planta de cosecha, correspondiente a 93.7%, mientras que en punto de venta es de un 94.7%, lo cual debe ser un aspecto para considerar, tomando en cuenta que las personas están llevando hasta sus mesas carne de pollo que bajo prácticas inadecuadas de inocuidad alimentaria podrían representar un peligro para quienes la consuman, especialmente para aquellas personas consideradas de riesgo (OMS 2018b).

La contaminación cruzada es uno de los principales errores que se cometen al momento de manipular alimentos de origen aviar, ya que si bien las bacterias del género *Salmonella* se inactivan durante la cocción y este tipo de productos no se suelen consumir crudos, puede ocurrir la contaminación de otros alimentos que no requieren cocción, tales como ensaladas y frutas que sean preparados en la misma área y utilizando los mismos utensilios (Herrera y Troyo 2011). Otro error común que se comete durante la manipulación de la carne de pollo es el lavado, ya que con esta práctica se diseminan agentes patógenos que pueden estar presentes en el pollo, tales como la *Salmonella* hacia otros alimentos y utensilios. También se recomienda contar con un termómetro para verificar que durante la cocción de la carne de pollo se alcance una temperatura interna de 74°C (CDC 2021b).

La presente investigación mostró que existen actualmente circulando en el país cepas de *Salmonella enterica* con capacidad de multirresistencia antimicrobiana, siendo de aún más atención aquellas que presentan entre su perfil de resistencia los antibióticos que usualmente se designan al tratamiento de la salmonelosis humana en personas con un sistema inmunológico comprometido, como lo son las cefalosporinas de tercera generación y los agentes combinados con amoxicilina (Ibarra et al. 2005).

Si bien las cefalosporinas de tercera generación no son muy utilizadas en la industria avícola, las bacterias del género *Salmonella* pueden obtener los genes de resistencia por medio de plásmidos que vienen de otras enterobacterias como la *Escherichia coli* (Carvajal et al. 2021).

Según Rivera (2012) se encontró un 16% de multirresistencia en planta de cosecha aviar, donde se catalogó como resistente a los aislamientos que contaban con resistencia a dos o más familias de antibióticos, mientras que para la presente investigación se tomó como multirresistente, aquellos aislamientos que presentaban resistencia a tres o más familias, aun así, el porcentaje de multirresistencia observado en la presente investigación fue mayor al encontrado por Rivera (Rivera 2012).

En otro estudio realizado en terneros destinados a consumo humano se encontró un 49.1% de aislamientos de *Salmonella enterica* con fenotipos de multirresistencia, siendo considerablemente mayor el encontrado en pollos de engorde (Ismael-Acle 2020). Este resultado puede estar relacionado con la presión de selección que sufren las bacterias en las aves de engorde, tomando en cuenta que su promedio de vida es alrededor de dos meses o menos, siendo considerablemente menor si se compara con otras especies destinadas al consumo humano (Cordero 2021).

4.2 Determinación de la presencia del gen *bla*$_{CMY-2}$ por PCR convencional

En los aislamientos con perfil de resistencia a la familia de los betalactámicos, específicamente resistentes a ceftazidima, ampicilina, cefotaxima y cefoxitin, donde no fue posible localizar el gen *bla*$_{CMY-2}$ utilizando ResFinder versión 4.0, se recurrió a la validación de los resultados por medio de PCR convencional. Sin embargo, únicamente se obtuvo la amplificación del control positivo correspondiente a la cepa de *Salmonella Typhimurium* (OPS-216), brindada por el INCIENSA.

La totalidad de los aislamientos que contaban con perfil de resistencia a los betalactámicos correspondían a *Salmonella* serovar Infantis y 71.6% contaban con la presencia del gen *bla*$_{CTX-M}$. Por lo que se determinó que el perfil de resistencia en estos aislamientos no estaba dado por *bla*$_{CMY-2}$ sino por *bla*$_{CTX-M}$, considerado actualmente el más importante de todas las BLEEs que surgen en enterobacterias a nivel mundial y que tiene estrecha relación con infecciones nosocomiales (Gonzales et al. 2019).

El restante 28.4% de aislamientos de *S.* Infantis con perfil fenotípico de resistencia a los betalactámicos que según ResFinder versión 4.0 no presentaba genes de resistencia a esta familia pudo estar relacionado a errores al momento de interpretar los resultados en la base de datos, ya que pueden existir otros genes que aún no son detectados por la misma. Sin embargo, para estimar el nivel de semejanza entre fenotipo y genotipo de una manera más significativa, es necesario además de la realización del método de Kirby-Bauer implementar el método de microdilución en caldo (Mensah et al. 2019).

4.3 Comparación de resultados fenotípicos y genotípicos

El perfil de resistencia fenotípico muestra los genes que la bacteria está expresando, los cuales le confieren capacidad de resistencia ante los antibióticos, mientras que el perfil de resistencia genotípico muestra lo que la bacteria tiene en su genoma, pero que no precisamente los está expresando (NHI 2021). Al comparar los perfiles fenotípicos con los genotípicos se obtiene que, para las familias de aminoglucósidos, betalactámicos y antagonistas del folato se encuentran diferencias significativas ($p<0.05$) entre lo que la bacteria está expresando y lo que guarda en su genoma.

En el caso de aminoglucósidos y antagonistas del folato se encontró un mayor porcentaje de resistencia a nivel genotípico si se compara con la resistencia a nivel de fenotipo, esto se puede deber a que estos genes de resistencia pueden provenir de otras enterobacterias que los comparten por medio de plásmidos y transposones, por lo que pueden estar presentes en las bacterias del género *Salmonella* aun cuando no se han expuesto a este antibiótico (García et al. 2010).

Se debe prestar especial atención a esta situación, dado que, como se mencionó anteriormente, los antagonistas del folato son medicamentos de elección para el tratamiento de salmonelosis en seres humanos y varias especies de animales, sin embargo, no se utilizan para el tratamiento de *Salmonella* en aves (INCIENSA 2020; Medivet 2021; OIE 2021).

En el caso de la familia de los betalactámicos se determinó un mayor porcentaje de resistencia en el perfil fenotípico, lo cual como se expuso anteriormente requiere de la implementación de otro análisis fenotípico como el método de microdilución en caldo

para estimar de manera más certera la semejanza con el genotipo (Mensah et al. 2019).

Con respecto a la familia de los fenicoles, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre fenotipo y genotipo, por lo que las bacterias del género *Salmonella* estarían expresando los genes de resistencia que guardan en su genoma para esta familia.

Los factores ambientales como la presión ejercida por antibióticos de amplio espectro que son utilizados en infecciones que no han sido correctamente diagnosticadas inducen la expresión de genes de resistencia, ya que las bacterias tratan de adaptarse a las condiciones adversas que se les presenten (INFOSAN 2005; Celis et al. 2017).

4.4 Determinación de los serovares de *Salmonella enterica* por secuenciación de genoma completo y análisis con SISTR versión 1.1.1

Al analizar los 71 aislamientos elegidos para la secuenciación de genoma completo se determinó que el serovar que se encontraba en mayor cantidad fue Infantis correspondiente a un 94.4% de los aislamientos, obtenido tanto a nivel de planta de cosecha, como de punto de venta, el restante 5.6% se trató de los serovares Kentucky y Anatum en igual cantidad para ambos, el serovar Anatum fue aislado de planta de cosecha y el serovar Kentucky en punto de venta. Al no encontrarse el serovar Kentucky en planta de cosecha su presencia en punto de venta podría estar relacionada a otras matrices cárnicas que usualmente se manipulan en conjunto con la carne de pollo, representando una contaminación cruzada.

Estos datos varían según los reportados por INCIENSA en su informe de vigilancia basado en laboratorio para *Salmonella* para el año 2013, donde el serovar Infantis correspondía a un 1.7% de los aislamientos de origen humano, mientras que Anatum fue un 6.3% de los serovares obtenidos de origen no humano, proveniente específicamente de cerdos, ambiente y alimentos balanceados, Kentucky por su parte correspondió a un 0.4% de los aislamientos de origen humano (INCIENSA 2013a).

Para el año 2020 INCIENSA reportó un 7.3% de aislamientos de *Salmonella* de origen humano, siendo importante destacar que parte de estos aislamientos fueron indistinguibles de dos cepas de *Salmonella* Infantis enviadas por LANASEVE, provenientes de avicultura, por lo que se sugirió la asociación con la ingestión de este alimento. Por otro lado, se encontrón un 0.4% del serovar Anatum, proveniente de aislamientos de origen humano (INCIENSA 2020).

En la presente investigación el serovar Anatum únicamente presentó resistencia a la familia de los betalactámicos, mientras que en el serovar Kentucky se determinó un 50.0% de multirresistencia, por su parte Infantis presentó un 97.0% de multirresistencia. Según INCIENSA para el año 2020 del total de aislamientos de *Salmonella* de origen humano, un 8.5% resultó resistente a los betalactámicos, un 90.5% pertenecían al serovar Infantis. Además, el 44.4% de los aislamientos de *Salmonella* Infantis presentó multirresistencia, siendo un porcentaje alto, pero menor al reportado en la presente investigación (INCIENSA 2020).

Algunas razones que pueden explicar el éxito que tiene *Salmonella* Infantis en la producción avícola son sus efectivos sistemas de adhesión a las células intestinales, así como la capacidad de adquirir cualidades de otras enterobacterias comensales que

cumplen un papel de reservorio de genes que le permiten adaptarse mejor a las condiciones ambientales a las que se verá expuesta en las granjas avícolas (Pulido 2021).

A nivel internacional, en países como Perú se habla del serovar Infantis como uno de los más comúnmente asociado a multirresistencia y producción de BLEEs (Quino et al. 2021). En el año 2019 en Estados Unidos se dio un brote de *Salmonella* Infantis multirresistente, las bacterias provenían de pollo crudo que había sido adquirido en sitios distintos con fines de consumo humano y también como alimento para mascotas, se reportaron 129 casos, 19.4% de hospitalizaciones y 0.8% de fallecimientos, por lo que se hizo un llamado a reforzar las buenas prácticas de manipulación de alimentos para evitar la contaminación cruzada (CDC 2019b).

Un estudio llevado a cabo en Costa Rica en el año 2019 con mapaches, los cuales pueden actuar como reservorios de *Salmonella*, habitantes de zonas urbanas detectó 7.1% del serovar Infantis del total de aislamientos (Baldi et al. 2019), siendo éste un serovar común en seres humanos y animales de producción, como los pollos de engorde, tal y como se evidenció en la presente investigación.

4.5 Determinación de la presencia de los genes *bla*$_{CMY-2}$ y *bla*$_{CTX-M}$ y otros genes de resistencia por secuenciación de genoma completo y análisis con ResFinder versión 4.0

Para la determinación de la presencia de los genes *bla*$_{CMY-2}$ y *bla*$_{CTX-M}$ y otros genes de resistencia se recurrió al software ResFinder 4.0, el cual es ampliamente utilizado tanto a nivel internacional como a nivel de Costa Rica por instituciones como INCIENSA para análisis genómicos, ya que el mismo permite, a partir de una

secuenciación de genoma completo, identificar una amplia gama de genes de resistencia a diversas familias de antibióticos de importancia en salud pública (Bortolaia et al. 2020).

La presencia de genes de resistencia en bacterias del género *Salmonella* es un problema de salud pública que cobra mayor importancia si se toma en cuenta que las enterobacterias cuentan con mecanismos que le permiten mutar y transferir genes de resistencia, tales como plásmidos, transposones e integrones y dicha transferencia se puede dar tanto entre la misma especie, como entre especies diferentes (López et al. 2016).

Existen amplios reportes de bacterias del género *Salmonella* que presentan un perfil de betalactamasas provenientes tanto de origen animal, como humano que son portadoras del gen $bla_{\text{CMY-2}}$ (Martin et al. 2012; INCIENSA 2020). No obstante, en la presente investigación, a pesar de haberse encontrado aislamientos con perfil de betalactamasas no se determinó la presencia de dicho gen, a pesar de que la evaluación se realizó por medio de ResFinder versión 4.0 y, además, PCR convencional.

Para el año 2020 INCIENSA reportó que en bacterias del género *Salmonella* que presentaban resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, fue encontrado el gen $bla_{\text{CTX-M-65}}$ en un 23.8% de los aislamientos, siendo estos del serovar Infantis, mientras que en la presente investigación se encontró un porcentaje mayor, correspondiente a un 67.6%, sin embargo, se dio en el mismo serovar, siendo del total de aislamientos del serovar Infantis un 71.6% portador de $bla_{\text{CTX-M-65}}$.

Los genes que codifican para BLEEs se transmiten por plásmidos y se pueden encontrar en transposones e integrones. Los plásmidos que portan genes de BLEEs suelen también conferir resistencia a los aminoglucósidos y las tetraciclinas (López et al. 2016). En la presente investigación el serovar Infantis presentó genes de resistencia para betalactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas.

Los tres serovares encontrados en la presente investigación presentaron genes de resistencia a los aminoglucósidos. El serovar con mayor variedad de genes de resistencia a los aminoglucósidos fue Infatins, seguido por el serovar Kentucky y finalmente Anatum, que presentó únicamente el gen *aac(6')-Iaa_1,* el cual estuvo presente en los 71 aislamientos a los cuales se les efectuó secuenciación de genoma completo.

Las enzimas AAA (6') inactivan a los antibióticos pertenecientes a la familia de los antibióticos por medio de acetilaciones en la posición 6', este mecanismo se considera bastante eficaz para inactivar a amikacina, sin embargo, no lo es tanto frente a gentamicina (Salipante y Hall 2003).

Un estudio llevado a cabo con aislamientos de *Salmonella* obtenidos de carne y huevos de pollo, provenientes de Brasil, Estados Unidos y China, determinó que un 70.6% portaba genes de resistencia a los aminoglucósidos, 26.6% a las tetraciclinas, 25.2% a fosfomicinas, 23.8% a las sulfonamidas y un 15.4% a los betalactámicos (Hu et al. 2020). En la presente investigación se encontró un 100% de genes de resistencia a los aminoglucósidos, 85.9% a las tetraciclinas, 35.2% a fosfomicinas, 85.9% a las sulfonamidas y un 67.6% a los betalactámicos, lo que resulta de mucha importancia, dado que el grado resistencia encontrado en la presente investigación

supera a los resultados del estudio de Hu y colaboradores en todas las familias de antibióticos reportadas.

Finalmente, se presentó un 85.9% de aislamientos que portaban el gen *floR_2* asociado con resistencia a la familia de los fenicoles como el cloranfenicol. Según un estudio llevado a cabo con aislamientos de *Salmonella* proveniente de diferentes matrices animales y vegetales de Estados Unidos y China, se determinó que portaban genes *floR_2* en asociación con otros genes como aac(3)-IVa_1, ant(3'')-Ia_1 y sul1_5 (Shang et al. 2021). Estos resultados coinciden con la presente investigación en la presencia de los cuatro genes anteriores en bacterias del género *Salmonella.*

5 CONCLUSIONES

5.1 Mediante pruebas fenotípicas utilizando el método de Kirby-Bauer se estableció que, a nivel de planta de cosecha de pollo de engorde y punto de venta, existe *Salmonella enterica* con perfil de resistencia a los aminoglucósidos, fenicoles, macrólidos, quinolonas, fluoroquinolonas, nitrofuranos, antagonistas del folato y betalactámicos, incluidas cefalosporinas de tercera generación.

5.2 Actualmente en dos puntos de la cadena de producción avícola de Costa Rica, correspondientes a planta de cosecha de pollo de engorde y punto de venta, existe *Salmonella enterica* catalogada como multirresistente. Además, se encontraron aislamientos de *Salmonella enterica* con resistencia simultánea a siete de las familias de antibióticos en estudio, representando un posible riesgo para la salud pública.

5.3 Se determinó por medio de pruebas de caracterización molecular la presencia en *Salmonella enterica* del gen bla_{CTX-M} que codifica para betalactamasas de espectro extendido, el cual puede estar participando en la resistencia a los betalactámicos evidenciada fenotípicamente en la presente investigación. Esto representa un riesgo, ya que estas enterobacterias tienen la capacidad de transmitir genes de resistencia a otras bacterias de la microbiota intestinal de los seres humanos y animales. A la vez se determinó la ausencia del gen bla_{CMY-2} por medio de Resfinder versión 4.0 y PCR convencional.

6 RECOMENDACIONES

6.1 A las escuelas de Medicina Veterinaria del país, reforzar la educación de los Médicos Veterinarios en el tema de resistencia a los antibióticos, especialmente para aquellos que se dediquen a la industria pecuaria, ya que los alimentos de origen animal son una de las vías más importantes por medio de la cual la resistencia está llegando hasta los hogares.

6.2 A las autoridades competentes, regular el uso de los antibióticos en Medicina Veterinaria, utilizando receta médica y bajo la supervisión del Médico Veterinario, con el fin de prevenir la resistencia antimicrobiana debido al uso inadecuado de estos fármacos.

6.3 A los Médicos Veterinarios dedicados a la industria avícola, promover el uso racional de los antibióticos a nivel de producción aviar, de manera que los diagnósticos de las aves sean confirmados con el fin de reducir terapias empíricas con antibióticos de amplio espectro.

6.4 A nivel de plantas de procesamiento, reforzar los procedimientos de Buenas Prácticas de Manufactura y los sistemas de HACCP, de manera que se disminuya la prevalencia de este patógeno en las carcasas y piezas de pollo que se distribuyen en puntos de venta y que llegan finalmente a la mesa del consumidor, que si bien no es

biológicamente posible llegar a cero tolerancia, se deben cuantificar las mismas para poder estimar así el riesgo.

6.5 A las autoridades competentes, se requiere un muestreo a mayor escala que permita evaluar de manera más asertiva la realidad nacional de Costa Rica con respecto a la presencia de genes de resistencia a los antibióticos en bacterias del género *Salmonella* dentro de la cadena de producción avícola y otras especies destinadas al consumo humano, sus implicaciones prácticas y la vía por medio de la cual las bacterias están adquiriendo la resistencia, con el fin de determinar las medidas de intervención más efectivas.

6.6 A los Médicos de humanos, velar por diagnósticos precisos, donde la terapia con antibióticos sea realmente necesaria y la adecuada según el tipo de infección, para que de esta manera se logre mitigar un el avance de la resistencia a los antibióticos.

6.7 Al consumidor de productos de origen aviar, llevar a cabo buenas prácticas de inocuidad alimentaria al preparar la carne de pollo, ya que las bacterias del género *Salmonella* son inactivadas con tiempos de cocción y temperaturas ya definidas. Además, la correcta utilización de los utensilios permite evitar la contaminación cruzada.

7 FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La investigación fue financiada con fondos destinados al proyecto "*Análisis de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entericas aisladas en diferentes puntos de la cadena de producción avícola nacional"*, el cual corresponde a un trabajo en conjunto entre el CINA de la Universidad de Costa Rica y la EMV-UNA, liderado por la Dra. Andrea Molina Alvarado y la Dra. Lohendy Muñoz Vargas, respectivamente. Además, se hizo uso de fondos destinados al proyecto SIA 0648-19 titulado *"Diversidad genómica de Salmonella entérica y genes de resistencia a los antimicrobianos en poblaciones humanas animales y alimentos en Costa Rica*" de la EMV-UNA. Asimismo, se contó con el apoyo económico del Fondo para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles en Investigación 2021 (FOCAES - Investigación 2021) de la Universidad Nacional.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams M, Moss M, McClure P. 2016. Food microbiology. United Kindom: Royal Society of Chemistry. p 264-279.

[AEMPS]. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2018. Ficha técnica Azitromicina [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/65548/65548_ft.pdf

[ALA]. Asociación Latinoamericana de Avicultura. 2019. Consumo Aparente de Pollo [Internet]. [citado el 01 de abril del 2020]. Disponible en: https://www.avicolatina.com/estadisticas/pollo/datos-estadisticos-de-producion-exportaciones-importaciones-y-consumo-hasta-2019

Alós J. 2003. Quinolones. Enferm Infecc Microbiol Clin. [Internet]. [citado el 20 de octubre del 2021]; 21 (5): 261-267. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12732116/ doi: doi: 10.1016/s0213-005x(03)72932-2.

Andino A, Hanning I. 2015. Salmonella enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars. Sci. World J. [Internet]. [citado el 27 de diciembre del 2019]; 15: 1-16. Disponible en: https://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/520179/ doi: 10.1155/2015/520179.

Andino A, Pendleton S, Zhang N, Chen W, Critzer F, Hanning I. 2014. Survival of Salmonella enterica in poultry feed is strain dependent. Poult. Sci. [Internet]. [citado el 29 de enero del 2020]; 93 (2): 441-447 Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24570467 doi: 10.3382/ps.2013-03401.

Arenas N, Moreno V. 2018. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. Infectio. [Internet]. [citado el 05 de febrero del 2022]; 22 (2): 110-119 Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v22n2/0123-9392-inf-22-02-00110.pdf

Avimex. 2022. Garacil. [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]; Disponible en: https://www.engormix.com/laboratorio-avimex-mexico/garacil-vacuna-sh557_pr333.htm#:~:text=nalid%C3%ADxico%20con%20acci%C3%B3n%20sin%C3%A9rgica%2C%20que,bacterianas%20en%20aves%20y%20cerdos.

Baldi M, Barquero E, Hutter S, Walzer C. 2019. Salmonellosis detection and evidence of antibiotic resistance in an urban raccoon population in a highly populated area, Costa Rica. Zoonoses Public Health [Internet]. [citado el 21 de octubre del 2021]; 2019 (66): 852-860 Disponible en: https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/17563/Salmonellosis%20detection%20and%20evidence%20of%20antibiotic%20resistance%20in%20an%20urban%20raccoon%20population%20in%20a%20highly%20populated%20area%2C%20Costa%20Rica.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Banco Nacional de ADN Carlos III. 2020. Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN [Internet]. [citado el 25 de febrero del 2022]; Disponible en: https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf

Bhunia A. 2008. Foodborne microbial pathogens. Estados Unidos: Springer. p. 201-214.

Biochem. 2022. Zeefobet [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]. Disponible en: http://www.sybrem.com.mx/adsnet/inventarios/productos_complemento/doc/4157FT%20Zeefobet.pdf

[bioMérieux]. bioMérieux. 2016. DensiCHEK Plus Instrument User Manual. North Carolina, USA [Internet]. [citado el 29 de enero del 2020]. Disponible en: https://es.scribd.com/document/415352004/User-Manual-514797-1ES2-DensiCHEK-Plus-Instrument-VITEK-2-Systems

Blondel C, Jiménez J, Contreras I, Santiviago C. 2009. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in Salmonella serotypes. BMC Genomics [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]; 10 (354): 1-17. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2907695/ doi: 10.1186/1471-2164-10-354.

Bortolaia V, Kaas R, Ruppe E, Roberts M, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe R, Rebelo A, Florensa A, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender J, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier B, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum M, Duggett N, Kempf I, NykÃ¤senoja S, Olkkola S, Wieczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup F. 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother [Internet]. [citado el 07 de octubre del 2021]; 75 (12): 3491-3500. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32780112/ doi: 10.1093/jac/dkaa345. PMID: 32780112; PMCID: PMC7662176.

Brenner F, Villar R, Angulo F, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. Salmonella nomenclature. J. Clin. Microbiol. [Internet]. [citado el 14 de enero del 2020]; 38 (7): 2465-2467. Disponible en: https://jcm.asm.org/content/38/7/2465

Briceño E, Ascanio E, Riera J, Arrieta D, Flores S, Maniglia G. 2010. Evidencia de residuos de cloranfenicol en muestras de riñón de cerdos de la región Central de Venezuela. Rev. cient. (Maracaibo) [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]; 20 (3): 254-258. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300006

Buncic C. 2006. Seguridad alimentaria integrada y salud pública. Zaragoza: Acribia. p. 5-25.

Buwenbo W, Aery S, Rwenyonyi C, Swedberg G, Kironde F. 2013. Point Mutations in the folP Gene Partly Explain Sulfonamide Resistance of Streptococcus mutans. Int J Microbiol. [Internet]. [citado el 20 de octubre del 2021]; 2013 (2013): 1-6. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596926/pdf/IJMB2013-367021.pdf doi: 10.1155/2013/367021

Carrada T. 2007. Fiebre tifoidea: caso clínico, estudio epidemiológico, patogenia,diagnóstico y tratamiento. Med Int Mex. [Internet]. [citado el 27 de febrero del 2022]; 23 (5): 447-457. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2007/mim075m.pdf

Carvajal E, Rueda E, Talavera M, Torres M, López D, Vásquez M. 2021. Resistencia a antibióticos betalactámicos y quinolonas en Escherichia coli aislada de pollos

broiler. Rev. investig. vet. Perú. [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]; 32 (2): e20012. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172021000200009&script=sci_abstract&tlng=en

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2019a. Drug resistant nontyphoidal Salmonella [Internet]. [citado el 15 de enero del 2020]. Disponible en: https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/nt-salmonella-508.pdf

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2019b. Brote de infecciones por Salmonella multirresistente vinculado a productos de pollo crudo [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]. Disponible en: https://www.cdc.gov/salmonella/infantis-10-18/index-esp.html

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2020. Salmonella [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.cdc.gov/salmonella/

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2021a. AR Gene Glossary [Internet]. [citado el 10 de octubre del 2021]. Disponible en: https://wwwn.cdc.gov/arisolatebank/GeneGlossary

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2021b. El pollo y la intoxicación por alimentos [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]. Disponible en: https://www.cdc.gov/foodsafety/es/chicken.html#:~:text=L%C3%A1vese%20las%20manos%20con%20agua,diferente%20para%20el%20pollo%20crudo.

Celis Y, Rubio V, Camacho M. 2017. Evolutionary origin of antibiotic resistance, a historical perspective. Rev. Colomb. Biotecnol. [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]; 19 (2):105-117. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v19n2/0123-3475-biote-19-02-00105.pdf

Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones M. Johnston C, Wigley P. 2009. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. Vet. Immunol. Immunopathol. [Internet]. [citado el 15 de enero del 2020]; 128 (1-3):53-9. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov /pubmed/19070366 doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.295.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, document M02-A13. 13. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2022. CLSI M100-ED32 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. [citado el 22 de febrero del 2022]. Disponible en: http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&scope=user

Contreras D, Valencia A, Gil M, Mejía L. 2021. Caracterización de pacientes con aislamiento de Salmonella spp en coprocultivo en una institución pediátrica en Cali-Colombia. Rev. med. UCR. [Internet]. [citado el 10 de diciembre del 2021]; 14 (2): 1-12. Disponible en: https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/medica/article/view/44181/44313

Contreras M. 2010. Salmonelosis aviar: métodos de prevención y control. [Internet]. [citado el 05 de febrero del 2022]; Disponible en: https://www.elsitioavicola.com/articles/1868/salmonelosis-aviar-matodos-de-prevencian-y-control/

Cordero K. 2021. Estimación del valor bruto de producción de la actividad cría de aves. [Internet]. [citado el 13 de enero del 2022]; Disponible en: https://www.bccr.fi.cr/indicadores-economicos/DocCuentasNacionales2017/Metodologia-cria-aves.pdf

Damle B, Vourvahis M, Wang E, Leaney J, Corrigan B. 2020. Clinical Pharmacology Perspectives on the Antiviral Activity of Azithromycin and Use in COVID-19. Clin Pharmacol Ther. [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]; 108 (2): 201-211. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32302411/ doi: 10.1002/cpt.1857

D' Aoust J, Maurer J. 2007. Food microbiology fundamentals and frontiers. In: Doyle M, Beuchat R, editores. Salmonella species. Estados Unidos: ASM. p. 187-236.

De la Fuente M, Dauros P, Bello H, Domínguez M, Mella S, Sepúlveda M, Zemelman R, González G. 2007. Mutaciones en genes gyrA y gyrB en cepas de bacilos Gram negativos aisladas en hospitales chilenos y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas. Rev Méd Chile [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]; 135 (9): 1103-1110. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872007000900002

Dinev I. 2010. Diseases of Poultry [Internet]. [citado el 25 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.elsitioavicola.com/publications/6/enfermedades-de-las-aves/245/pullorosis/

Doma A, Popescu R, Mituleţu M, Muntean D, Dégi J, Boldea M, Radulov I, Dumitrescu E, Muselin F, Puvača N, Cristina RT. 2020. Comparative Evaluation of qnrA,

qnrB, and qnrS Genes in Enterobacteriaceae Ciprofloxacin-Resistant Cases, in Swine Units and a Hospital from Western Romania. Antibiotics (Basel). [Internet]. [citado el 20 de octubre del 2021]; 9 (10): 1-12. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33066610/ doi: 10.3390/antibiotics9100698.

Donado P, Clavijo V, León M, Arevalo A, Castellanos R, Bernal J, Tafur M, Ovalle M, Alali W, Hume M, Romero J, Walls I, Doyle M. 2014. Counts, serovars, and antimicrobial resistance phenotypes of Salmonella on raw chicken meat at retail in Colombia. J Food Prot. [Internet]. [citado el 24 de octubre del 2021]; 77 (2): 227-235. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24490916/ doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-276. PMID: 24490916.

Errecalde J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]; Disponible en: http://www.fao.org/3/y5468s/y5468s00.htm#Contents

Errecalde C, Prieto G, Puelles I, García H. 2000. Disposición plasmática de amikacina en cabras, aplicada por vía intramuscular. Arch. med. vet. [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]; 32 (2): 253-258. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2000000200014&script=sci_arttext

Espinoza R, Valenzuela C, Amaya F, Urrutia I, Contreras I, Santiviago C. 2017. Differential roles for pathogenicity islands SPI-13 and SPI-8 in the interaction of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhi with murine and human macrophages. Biol. Res. [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]; 50 (5): 1-

17. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5311848/ doi: 10.1186/s40659-017-0109-8.

Fandiño L, Verjan N. 2019. A common Salmonella Enteritidis sequence type from poultry and humans gastroenteritis in Ibagué, Colombia. Biomedica [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]; 39(19): 50-62. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31529848 doi: 10.7705/biomedica.v39i1.4155.

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.fao.org/3/y5468s/y5468s00.htm#Contents

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2005. Evaluaciones de riesgos de Salmonella en huevos y pollo para asar. [Internet]. [citado el 25 de marzo del 2020]. Disponible en: http://www.fao.org/3/y4393s/y4393s00.htm

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. Good practices for the feed industry [Internet]. [citado el 16 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.fao.org/3/i1379e/i1379e00.htm

Farbio Pharma. 2021. Bactrivet aves [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]. Disponible en: https://farbiopharma.com/producto/bactrivet-aves/

Farfán M, Flores O, Navarro N, Prado V, Mora G, Toro C. 2002. Caracterización molecular de mecanismos de resistencia a cloranfenicol en cepas de Shigella flexneri aisladas en niños chilenos con diarrea aguda. Rev. méd. Chile [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]; 130 (3): 275-280. Disponible en:

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872002000300005

[FDA]. Food and Drug Administration. 2014. Water Activity (aw) in Foods [Internet]. [citado el 16 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/water-activity-aw-foods

[FERG] Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Transmisión Alimentaria. 2015. Estimación de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria [Internet]. [citado el 01 de abril del 2020]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-cha-estim-oms-carga-mundial-transm-alimen.pdf

Fernandez A, García C, Sáez J, Valdezate S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de bacteriología. [Internet]. [citado el 24 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf

Figueroa I, Verdugo A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. Rev Latinoam. Microbiol. [Internet]. [citado el 22 de enero del 2020]; 47 (1-2): 25-42. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf

Forsythe S, Hayes P. 1999. Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. 2. ed. Zaragoza: Acribia. p. 27-34.

Forsythe. 2010. The microbiology of safe food. 2. ed. United Kindom: Willey Blackwell. p 157-162.

Friend M, Franson J. 1999. Field manual of wildlife diseases. Estados Unidos: USGS. p.99-110.

García C, Pardos M, Castillo F. 2010. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]; 28 (1): 12-18. Disponible en: https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2008-bacteriologia1.pdf

Gómez L. 2017. Revisión del manejo de las infecciones por Salmonella no typhi en niños [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]. Disponible en: https://sepeap.org/revision-del-manejo-de-las-infecciones-por-salmonella-no-typhi-en-ninos/

Gonzales E. 2015. Incremento de aislamientos de Salmonella spp. productora de β-lactamasas de espectro extendido en pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Salud del Niño. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública [Internet]. [citado el 30 de enero del 2020]; 32 (3): 605-607. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000300030

Gonzales E, Patiño L, Ore E, Martínez V, Moreno S, Cruzado N, Rojas R, Quispe M, Carbonell I, Villareal F, Maza G, Olivo J, Vicuña R, Bustamante D. 2019. β-lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M en aislamientos clínicos de

Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae en el Instituto Nacional de Salud del Niño-Breña, Lima, Perú. Rev Med Hered [Internet]. [citado el 16 de diciembre del 2021]; 30 (4): 242-248. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2019000400005 doi: http://dx.doi.org/10.20453/rmh.v30i4.3659

Hafez M. 2001. Salmonella infections in poultry: diagnosis and control. Period. Biol. [Internet]. [citado el 09 de enero del 2020]; 103 (2): 103-113. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/287730931_Salmonella_infections_in_poultry_Diagnosis_and_control

Hayward R, Harding J, Molloy R, Land L, Longcroft-Neal K, Moore D, Ross JDC. 2018. Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. Br J Clin Pharmacol. [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]; 84 (2): 223-238. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5777443/ doi: 10.1111/bcp.13439

Heider L, Hoet A, Wittum T, Khaitsa M, Love B, Huston C, Morley P, Funk J, Gebreyes W. 2009. Genetic and phenotypic characterization of the bla(CMY) gene from Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from food-producing animals, humans, the environment, and retail meat. Foodborne Pathog. Disease [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]; 6 (10): 1235-40. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19743925 doi: 10.1089/fpd.2009.0294

Henderson S, Bounous D, Lee M. 1999. Early events in the pathogenesis of avian Salmonellosis. Infect. Immun. [Internet]. [citado el 10 de enero del 2020]; 67 (7):

3580–3586. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC116547/

Hensel M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. Int. J. Med. Microbiol. [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]; 294 (2-3): 95-102. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/8222894_Evolution_of_pathogenicity_islands_of_Salmonella_enterica doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.025.

Herrera L, Troyo J. 2011. Conceptos Básicos para la Manipulación de alimentos. Instituto Nacional de Aprendizaje. [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]; Disponible en: https://www.ina.ac.cr/alimentos/Documentos%20compartidos/folleto.pdf

Hu L, Cao G, Brown E, Allard M, Ma L, Khan A, Zhang G. 2020. Antimicrobial resistance and related gene analysis of Salmonella from egg and chicken sources by whole-genome sequencing. Poult. [Internet]. [citado el 24 de octubre del 2021]; 99 (12): 7076-7083. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579120307628 doi: https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.011

Huertas G. 2020. Análisis descriptivo de la prevalencia y resistencia antimicrobiana de Salmonella enterica no tifoidea durante el periodo postparto de vacas lecheras en la Región Central y Norte de Costa Rica. Campus Benjamín Núñez, Heredia: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional de Costa Rica.

Huovinen P. 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis. [Internet]. [citado el 20 de octubre del 2021]; 32 (11): 1608-1614. Disponible en:

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11340533/ doi: 10.1086/320532. Epub 2001 May 4.

Ibarra F, Bascopé S, Bazan Y, Bejarano H, Bustamante R, Cadima M, Peláez C. 2005. Sensibilidad y resistencia de las Salmonellas a los antimicrobianos en la ciudad de Cochabamba. Gac. Med. Bol. [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]; 28 (1): 3-7. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662005000100002

[Illumina]. Illumina. 2021. Secuenciación: Tecnología de Illumina [Internet]. [citado el 06 de octubre del 2021]. Disponible en: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/sequencing-illumina-technology-wbt-esp/story_html5.html?iframe

[INCIENSA] Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. 2013a. Informe de vigilancia basada en el laboratorio: Salmonella, Costa Rica, 2013 [Internet]. [citado el 10 de enero del 2020]. Disponible en: https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2014/Bacterias/Vigilancia%20basada%20en%20laboratorio%20de%20Salmonella,%20Costa%20Rica,%202013.pdf

[INCIENSA] Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. 2013b. Agentes causantes de diarrea y otras infecciones, por región y laboratorio, 1 – 31 de marzo de 2013 [Internet]. [citado el 10 de enero del 2020]. Disponible en: https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2013/

Bacterias/Agentes%20causantes%20de%20diarrea%20%20y%20otras%20infecciones,%20marzo%202013.pdf

[INCIENSA] Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. 2020. Informe de vigilancia basada en el laboratorio: Salmonella spp. Costa Rica, 2018 [Internet]. [citado el 09 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2020/CNRB/Vigilancia%20de%20laboratorio%20de%20Salmonella%20spp.,%20Costa%20Rica%202018.pdf

[INFOSAN] Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de Alimentos. 2005. Resistencia antimicrobiana a Salmonella [Internet]. [citado el 10 de enero del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_Salmonella_Apr05_sp.pdf

Insunza M, Soto A. 1998. Salmonelosis: Una enfermedad que se transmite por alimentos. Tecno vet. [Internet]. [citado el 01 de abril del 2020]. Disponible en: http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9562%2526ISID%253D457,00.html

Ismael-Acle, F. 2020. Prevalencia de Salmonella enterica no tifoidal en heces y tejidos linfáticos de terneros para consumo humano en dos plantas de cosecha en Costa Rica. Campus Benjamín Núñez, Heredia: Tesis (Licenciatura) Universidad Nacional de Costa Rica.

[JB] James Brown Pharma. 2022. AZITRO-VET [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]. Disponible en: https://www.jamesbrownpharma.com/producto/azitro-

vet/#:~:text=Indicaciones%3A,piodermatitis%20en%20caninos%20y%20felinos.

Jenkins A, Thomson A, Brown N, Semple Y, Sluman C, MacGowan A, Lovering A, Wiffen P. 2016. Amikacin use and therapeutic drug monitoring in adults: do dose regimens and drug exposures affect either outcome or adverse events? A systematic review. J Antimicrob Chemother. [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]; 71 (10): 2754-2759. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27494904/ doi: 10.1093/jac/dkw250. Epub 2016 Jul 11.

Jiménez A. 2016. Zoonosis alimentarias Salmonella. [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]. Disponible en: http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017940.pdf

Jiménez J, Dialá K, Chacón N. 2017. Manejo de infecciones del tracto urinario. Rev. costarric. salud pública [Internet]. [citado el 17 de octubre del 2021]; 26 (1): 1-10. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292017000100001

Jolley K, Bray J, Maiden M. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res [Internet]. [citado el 07 de octubre del 2021]; 3 (124): 1-20. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30345391/ doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.PMID:30345391;PMCID:PMC6192448.

King N, Lake R, Cressey P. 2011. Risk Profile: Salmonella (non-typhoidal) in Poultry (whole and pieces). Ministry for Primary Industries [Internet]. [citado el 27 de

diciembre del 2019]. Disponible en: https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/6256/direct

Kepro. 2022. AMPICILLIN 50% WSP [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]. Disponible en: https://www.kepro.nl/es/products/ampicillin-50-wsp-5/#:~:text=En%20las%20aves%20de%20corral,.%2C%20enteritis%20provocadas%20por%20E.

Kwon H, Park K, Yoo H, Park J, Park Y, Kim S. 2000. Differentatiation of Salmonella enterica serotype gallinarum biotype pullorum from biotype gallinarum by analysis of phase 1 flagellin C gene (fliC). J. Microbiol. Methods [Internet]. [citado el 20 de diciembre del 2019]; 40 (1): 33-8. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10739340 doi: 10.1016/s0167-7012(99) 00129-3.

Lawson B, Pinna E, Horton R, Macgregor S, John S, Chantrey J, Duff J, Kirkwood J, Simpson V, Robinson R, Wain J, Cunningham A. 2014. Epidemiological evidence that garden birds are a source of human's salmonellosis in England and wales. PLos one [Internet]. [citado el 20 de enero del 2020]; 9 (2): e88968. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935841/ doi: 10.1371/journal. pone.0088968.

López D, Torres M, Prada C. 2016. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. Univ. Salud [Internet]. [citado el 18 de octubre del 2021]; 18 (1): 190-202. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v18n1/v18n1a18.pdf

Lutful S. 2010. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. Int. J. Environ. Res. Public. Health [Internet]. [citado el 15 de enero del 2020]; (1):89-114. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20195435 doi: 10.3390/ijerph7010089.

[MAG] Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2014. Departamento de Farmacovigilancia [Internet]. [citado el 20 de enero del 2020]. Disponible en: http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/010917015245.pdf

Maldonado N, Castro B, Berrio I, Manjarrés M, Robledo C, Robledo J. 2017. Resistencia a ertapenem en 2 instituciones hospitalarias de alto nivel de complejidad: microbiología, epidemiología y factores de riesgo. Enferm Infecc Microbiol Clin. [Internet]. [citado el 24 de octubre del 2021]; 35 (8): 509-513. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-ertapenem-2-instituciones-hospitalarias-S0213005X15004450 doi: 10.1016/j.eimc.2015.11.009

Mansfield K, Fox J. 2019. The Common Marmoset in Captivity and Biomedical Research. [Internet]. [citado el 25 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/book/9780128118290/the-common-marmoset-in-captivity-and-biomedical-research doi: 10.1016/B978-0-12-811829-0.00016-9.

Martin L, Weir E, Poppe C, Reid-Smith R, Boerlin P. 2012. Characterization of blaCMY-2 plasmids in Salmonella and Escherichia coli isolates from food animals in Canada. Appl. Environ. Microbiol. [Internet]. [citado el 30 de enero del 2020]; 78

(4): 1285-1287. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3273016/ doi: 10.1128/AEM.06498-11.

Martínez S, Pons M, Ruiz L, Laureano L, Corujo A, Ochoa T, Ruiz J. 2020. Resistencia a nitrofuranos en Salmonella enterica aisladas de carne para consumo humano. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. [citado el 17 de octubre del 2021]; 37 (1): 99-103. Disponible en: https://scielosp.org/article/rpmesp/2020.v37n1/99-103/ doi: https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4745

MedCalc. 2022. MedCalc Version 20.027 [Internet]. [citado el 25 de febrero del 2022]. Disponible en: https://www.medcalc.org/calc/

[Medivet] Dirección de Medicamentos Veterinarios. 2021. Centro de consulta de Medivet [Internet]. [citado el 15 de septiembre del 2021]. Disponible en: http://sistemas.senasa.go.cr/Medivet/Home

[MedlinePlus]. 2020. United States National Library of Medicine [Internet]. [citado el 25 de marzo del 2020]. Disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000294.htm

Melo J, Harkes R, Elías J. 2007. Sensibilidad de aislamientos de Salmonella gallinarum de Argentina a diferentes antimicrobianos [Internet]. [citado el 05 de febrero del 2022]. Disponible en: https://www.engormix.com/avicultura/articulos/sensibilidad-aislamientos-salmonella-gallinarum-t27139.htm

Mensah N, Tang Y, Cawthraw S, AbuOun M, Fenner J, Thomson N, Mather A, Petrovska L. Determining antimicrobial susceptibility in Salmonella enterica serovar Typhimurium through whole genome sequencing: a comparison against multiple phenotypic susceptibility testing methods. [Internet]. [citado el 02 de marzo del 2022]; 19 (148): 1-10. Disponible en: https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12866-019-1520-9.pdf doi: https://doi.org/10.1186/s12866-019-1520-9

Molina A, Granados F, Jiménez M, Acuña M, Alfaro M, Chavarría G. 2016. Vigilance for Salmonella in Feedstuffs Available in Costa Rica: Prevalence, Serotyping and Tetracycline Resistance of Isolates Obtained from 2009 to 2014. Foodborne Pathog Dis. [Internet]. [citado el 28 de enero del 2022]; 13 (3): 119-27. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26682678/ doi: 10.1089/fpd.2015.2050

Mooijman K. 2018. The new ISO 6579-1: A real horizontal standard for detection of Salmonella, at last!. Food Microbiol. [Internet]. [citado el 28 de enero del 2020]; 71 (2018): 2-7. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/314287105_The_new_ISO_6579-1_A_real_horizontal_standard_for_detection_of_Salmonella_at_last doi: 10.1016/j.fm.2017.03.001.

Mosquito S, Ruiz J, Bauer J, Ochoa T. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica. [Internet]. [citado el 13 de enero del 2022]; 28 (4): 648-656. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf

Muñoz L, Finney S, Hutchinson H, Masterson M, Habing G. 2017. Impact of Clinical Salmonellosis in Veal Calves on the Recovery of Salmonella in Lymph Nodes at Harvest. Foodborne Pathog Dis. [citado el 28 de enero del 2020]; 14 (11): 678-685. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28910140/ doi: 10.1089/fpd.2017.2303.

[NARMS]. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria. 2019. Glossary of Terms Related to Antibiotic Resistance [Internet]. [citado el 25 de septiembre del 2021]. Disponible en: https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html

[NHI] National Human Genome Research Institute. 2021. Genotipo [Internet]. [citado el 21 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Genotipo

[OIE] Organización Mundial de la Sanidad Animal. 2021. Prevención, Detección y Control de las Infecciones de Aves de Corral por Salmonella. [Internet]. [citado el 05 de febrero del 2022]. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salmonella.pdf

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2015. Datos y cifras sobre las enfermedades de transmisión alimentaria [Internet]. [citado el 19 de enero del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg infographics/ es/

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [citado el

20 de enero del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2018a. Fiebre tifoidea [Internet]. [citado el 26 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/features/qa/typhoid-fever/es/

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2018b. Salmonella (no tifoidea) [Internet]. [citado el 17 de enero del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2019. Inocuidad de los alimentos [Internet]. [citado el 01 de abril del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2020a. Enfermedades de transmisión alimentaria [Internet]. [citado el 15 de enero del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2020b. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/topics/antimicrobial_resistance/es/

[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2017. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.who.int/topics/antimicrobial_resistance/es/

Ortiz F, Weiler N, Alvarez M, Orrego M, Kawabata A, Riera E, López C, Acosta L, Nagai M, Portillo R, Arguello R, Mereles E. 2021. Resistencia a múltiples antibióticos

en serovariedades de Salmonella aisladas de muestras clínicas y alimentos. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud [Internet]. [citado el 09 de diciembre del 2021]. 19 (1): 37-47. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282021000100037&lng=es&nrm=iso&tlng=es doi: https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.01.37

Paciel D, Seija V, Prieto J, Vignoli R, Medina J, Savio E. 2011. Enterobacterias productoras de KPC (Klebsiella Pneumoniae carbapenemasa. Rev. Tendencias. [Internet]. [citado el 27 de marzo del 2020]. Disponible en: http://www.infectologia.edu.uy/images/stories/pdf/publicaciones/biomedicas/tendencias/KPC_pacieletal.pdf

Pérez D. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Inf. Ter. Sist. Nac. Salud [Internet]. [citado el 29 de marzo del 2020]. 22 (3): 57-67. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf

Pérez F, Hanson N. 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β-Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. J Clin Microbiol. [Internet]. [citado el 09 de mayo del 2022]. 40 (6): 2153-2162. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130804/ doi: 10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002

Pulido M. 2021. Salmonella Infantis: ¿un serotipo emergente que se volvió residente? [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]. Disponible en:

https://www.adiveter.com/salmonella-infantis-un-serotipo-emergente-que-se-volvio-residente/

[Qiagen]. Qiagen. 2016. Embrace the Future of Electrophoresis. Germany [Internet]. [citado el 18 de septiembre del 2021]. Disponible en: https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=0c32aae5-6a0b-4596-b99d-9940b35482cd&lang=en

[Qiagen]. Qiagen. 2020. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. Germany [Internet]. [citado el 18 de septiembre del 2021]. Disponible en: https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/

Quino W, Hurtado C, Escalante O, Flores D, Mestanza Or, Vences F, Zamudio M, Gavilán R. 2019. Multidrogorresistencia de Salmonella Infantis en Perú: un estudio mediante secuenciamiento de nueva generación. Rev. perú. med. exp. salud publica [Internet]. [citado el 24 de octubre del 2021]; 36 (1): 37-45. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342019000100006&lng=es doi: http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.3934.

Quirós S. 2016. Infecciones por bacterias del género Salmonella: Relevancia en la práctica clínica. Rev. Cl. EMed. UCR. [Internet]. [citado el 22 de diciembre del 2019]; 6 (4): 11-21. Disponible en: https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/clinica/article/ view/26925. doi: 10.15517/RC_UCR-HSJD.V6I4.26925

Ramírez M. Tolmasky M. 2017. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. Molecules. [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]; 2267 (22): 1-23. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29257114/ doi: 10.3390/molecules22122267

Rey C, Annes I, Santos M, Merces A, Pereira R, Christakis S, Prazeres D, Siciliano S. 2016. Characteristics of Salmonella spp. Isolated from wild birds confiscated in ilegal trade markets, Rio de Janeiro, Brazil. BioMed Research Internacional [Internet]. [citado el 15 de enero del 2020]; 16: 1-7. Disponible en: https://www.hindawi.com/ journals/bmri/2016/3416864/ doi. 10.1155/2016/3416864.

Rivera, W. 2012. Identificación y diagnóstico de los puntos de la línea de procesamiento que generan riesgo de contaminación con Salmonella sp. en una planta procesadora de pollo: presencia, cuantificación y serotipificación del patógeno. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, C.R.: Tesis (Licenciatura) Universidad de Costa Rica.

Ruiz J, Navia M, Marco F, Vila J. 2004. Mecanismos de resistencia a betalactámicos y ácido nalidíxico en aislados clínicos de Salmonella enterica serotipo hadar y bsilla. Enferm Infecc Microbiol Clin. [Internet]. [citado el 20 de octubre del 2021]; 22 (4): 252-253. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-resistencia-betalactamicos-acido-nalidixico-13059060

Ruiz J, Suárez M, Uribe C. 2006. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de Salmonella spp. en granjas de ponedoras comerciales del departamento de

Antioquia. Rev Col Cienc Pec [Internet]. [citado el 13 de enero del 2022]; 19 (3): 297-305. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v19n3/v19n3a06.pdf

Ryan M, O' Dwyer J, Adley C. 2017. Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen Salmonella. BioMed. Res. Int. [Internet]. [citado el 28 de diciembre del 2019]; 17: 1-16. Disponible en: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/3782182/ doi: 10.1155/2017/3782182

[SAG]. Servicio Agrícola y Ganadero. 2016a. Salmonelosis aviar. [Internet]. [citado el 22 de enero del 2020] Disponible en: https://www.sag.gob.cl/sites/default/files /f_tecnica_salmonelosis_aviar_v2-2016.pdf

[SAG]. Servicio Agrícola y Ganadero. 2016b. Tifosis aviar. [Internet]. [citado el 25 de marzo del 2020] Disponible en: https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_tifosis_aviar_v2-2016.pdf

Saito S, Koori Y, Ohsaki Y, Osaka S, Oana K, Nagano Y, Arakawa Y, Nagano N. 2017. Third-Generation Cephalosporin-Resistant Non-Typhoidal Salmonella Isolated from Human Feces in Japan Jpn. J. Infect. Dis. [Internet]. [citado el 13 de enero del 2022]; 70 (3): 301-304. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27580578/

Salipante S, Hall B. 2003. Determining the limits of the evolutionary potential of an antibiotic resistance gene. Mol Biol Evol. [Internet]. [citado el 24 de octubre del 2021]; 20 (4): 653-659. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12679553/ doi: 10.1093/molbev/msg074

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020a. Protocolo vigilancia epidemiológica de Salmonella en pollos de engorde [Internet]. [citado el 18 de octubre del 2021]. Disponible en: http://www.senasa.go.cr/informacion/centro-de-informacion/informacion/sgc/pnsa/protocolos-de-vigilancia-epidemiologica/salmonella/4061-pn-avi-pv-07-v05-protocolo-de-vigilancia-y-control-de-salmonella-en-pollos-de-engorde/file

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020b. Protocolo vigilancia epidemiológica de Salmonella en aves reproductoras [Internet]. [citado el 29 de enero del 2020]. Disponible en: http://www.senasa.go.cr/informacion/centro-de-informacion/ informacion/sgc/pnsa/protocolos-de-vigilancia-epidemiologica/salmonella/4064-pn-avi-pv-04-v10-protocolo-vigilancia-epidemiologica-salmonella-aves-reproductoras/ file

[SENASA] Servicio Nacional de Salud Animal. 2020c. Resultados del Plan Nacional de Residuos 2020 [Internet]. [citado el 19 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.senasa.go.cr/informacion/centro-de-informacion/informacion/sgc/pnresi/5612-informe-general-plan-de-residuos-2020/file

Seth H. 2008. SPI-7: Salmonella’s Vi-Encoding Pathogenicity Island. J. Infect. Developing Countries [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]; 2 (4): 267-271. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/26539087_SPI-7_Salmonella's_Vi-Encoding_Pathogenicity_Island doi: 10.3855/jidc.220.

Seuc A, Domínguez E, Díaz O. 2000. Introducción a los DALYs. Rev. Cuabana Hig. Epidemiol. [Internet]. [citado el 01 de abril del 2020]; 38 (2): 92-101, Disponible

en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032000000200002

Shang Y, Sun Q, Chen H,Wu Q, Chen M,Yang S,Du M, Zha F,Ye Q, Zhang J. 2021. Isolation and Characterization of a Novel Salmonella Phage vB_SalP_TR2. Front. Microbiol. [Internet]. [citado el 24 de octubre del 2021]; 12:664810. Disponible en: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.664810/full doi: https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664810

Shivaprasad H, Barrow P. 2008. Diseases in poultry. 12. ed. In: Saif Y, editor. Pullorum disease and fowl typhoid. Estados Unidos: Blackwell. p. 619-674.

Terzolo H. 2004. Salmonellosis en el hombre, las aves y su implicancia en microbiología de los alimentos [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/280804527_Salmonelosis_en_el_hombre_las_aves_y_su_implicancia_en_microbiologia_de_los_alimentos

Terzolo H. 2009. Tifosis y paratifosis de las aves en Latinoamerica y el mundo [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/280950819_Tifosis_y_paratifosis_de_las_aves_en_Latinoamerica_y_en_el_mundo

[Thermo Fisher Scientific] Thermo Fisher Scientific. 2015. Invitrogen Platinum Green Hot Start PCR 2X Master Mix. USA [Internet]. [citado el 13 de octubre del 2021]. Disponible en: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Platinum_Green_Hot_Start_PCR_Master_Mix_UG.pdf

[Thermo Fisher Scientific]. Thermo Fisher Scientific. 2017. Qubit™ 3 Fluorometer. Singapore [Internet]. [citado el 06 de octubre del 2021]. Disponible en: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0010866_Qubit_3_Fluorometer_UG.pdf?_ga=2.195042799.217043881.1633559638-1901079452.1633559638

Tortora G, Funke B, Case C. 2007. Introducción a la Microbiología. 9. ed. España: Medica Panamericana. p. 323.

[UniProt]. Universal Protein Resource. 2021. UniProtKB - A0A1C9T847 (A0A1C9T847_SALET) [Internet]. [citado el 10 de octubre del 2021]. Disponible en: https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1C9T847

[USDA]. United States Department of Agriculture. 2013. Cost Estimates of Foodborne Ilnesses [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx

[USDA]. United States Department of Agriculture. 2014. Módulo 23: uso de antibióticos en animales [Internet]. [citado el 06 de febrero del 2022]. Disponible en: https://www.cfsph.iastate.edu/pdf-library/Acreditacion-Veterinaria/NVAP-Mod23-Antibiotics-in-Animals.pdf

[USDA]. United States Department of Agriculture. 2015. Economic Burden of Major Foodborne Illnesses Acquired in the United States [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]. Disponible en: https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/43984/52807_eib140.pdf

Vass M, Hruska K, Franek M. 2008. Nitrofuran antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. Veterinarni Medicina [Internet]. [citado el 18 de octubre del 2021]; 53 (9): 469-500. Disponible en: https://www.agriculturejournals.cz/web/vetmed.htm?volume=53&firstPage=469&type=publishedArticle

Wilson R, Winter S, Spees A, Winter M, Nishimori J, Sanchez J, Nuccio S, Crawford R, Tükel C, Bäumler A. 2011. The Vi Capsular Polysaccharide Prevents Complement Receptor 3-Mediated Clearance of Salmonella enterica Serotype Typhi. Infect. Immun. [Internet]. [citado el 28 de marzo del 2020]; 79 (2): 830-837. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3028862/ doi: 10.1128/IAI.00961-10.

Wray C, Davies R, Evans S. 1999. Ciencia de la carne de ave. Zaragoza: Acribia. p. 291-312.

Wu J, Ko W, Tsai S, Yan J. 2007. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QnrA, QnrB, and QnrS among Clinical Isolates of Enterobacter cloacae in a Taiwanese Hospital. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. [citado el 20 de octubre del 2021]; 51 (4): 1223-1227. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1855486/ doi: 10.1128/AAC.01195-06

Xiaoliang W, Huiming H, Chunlei C, Beiwen Z. 2019. Genomic characterisation of a colistin-resistant Klebsiella pneumoniae ST11 strain co-producing KPC-2, FloR, CTX-M-55, SHV-12, FosA and RmtB causing a lethal infection. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. [citado el 12 de octubre del 2021]; 19 (2019): 78-

80. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31493525/ doi: 10.1016/j.jgar.2019.08.023

Xiong D, Song L, Pan Z, Jiao X. 2018. Identification and Discrimination of Salmonella enterica Serovar Gallinarum Biovars Pullorum and Gallinarum Based on a One-Step Multiplex PCR Assay. Front Microbiol. [Internet]. [citado el 14 de junio del 2020]; 1718 (9): 1-9. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6079294/pdf/fmicb-09-01718.pdf doi: 10.3389/fmicb.2018.01718

Yoshida C, Kruczkiewicz P, Laing C, Lingohr E, Gannon V, Nash J, Taboada E. 2016. The Salmonella In Silico Typing Resource (SISTR): An Open Web-Accessible Tool for Rapidly Typing and Subtyping Draft Salmonella Genome Assemblies. PLOS ONE [Internet]. [citado el 07 de octubre del 2021]; 11 (1): 1-17. Disponible en: https://journals.plos.org/plosone/article/citation?id=10.1371/journal.pone.0147101 doi:10.1371/journal.pone.0147101