



**EVALUACIÓN DE FACTORES QUIMIOTÁCTICOS Y SU POSIBLE RELACIÓN CON
LA VARIACIÓN A LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS DE
SALMONELLA ENTÉRICA SEROTIPO *ENTERITIDIS***

**EDNA TATIANA RODRIGUEZ ROMERO
NUTRICIONISTA DIETISTA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA
BOGOTÁ D.C 2014**

Evaluación de factores quimiotácticos y su posible relación con la variación a la sensibilidad a antibióticos en aislados de *Salmonella entérica* serotipo *Enteritidis*

Edna Tatiana Rodríguez Romero
Nutricionista Dietista

Tesis presentada como requisito para optar por el Título de:
Magister en Bioquímica

Director de proyecto
Milton J. Crosby Granados
Q.F M.Sc. PhD. Profesor Asociado
Dpto. de Farmacia.

Línea de Investigación:
Patología infecciosa e Inmunológica
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

Bogotá D.C. 2014

DEDICATORIA

Una dedicatoria muy especial merecen mis padres, quienes son el motor de mi vida;

A mis hermanos, por su amor incondicional pese a la distancia;

A mis amigos y familiares quienes confiaron en mí

y me dieron ánimo para seguir adelante.

A mi Jefe y compañeros de Interventoría por su inmenso apoyo.

Todos ustedes hacen parte de este gran logro.

AGRADECIMIENTOS

¹Te doy gracias, Señor, de todo corazón;
delante de los ángeles tañeré para ti,
²me postraré hacia tu santuario,
daré gracias a tu nombre:
por tu misericordia y tu lealtad,
porque tu promesa supera a tu fama;
³cuando te invoqué, me escuchaste,
acreciste el valor en mi alma.

⁴Que te den gracias, Señor, los reyes de la tierra,
al escuchar el oráculo de tu boca;
⁵canten los caminos del Señor,
porque la gloria del Señor es grande.

⁶El Señor es sublime, se fija en el humilde,
y de lejos conoce al soberbio.

⁷Cuando camino entre peligros,
me conservas la vida;
extiendes tu brazo contra la ira de mi enemigo,
y tu derecha me salva.

⁸El Señor completará sus favores conmigo:
Señor, tu misericordia es eterna,
no abandones la obra de tus manos.

Salmo 137 (138)

*A Ph.D Milton Josué Crosby Granados profesor asociado del Departamento de Farmacia por sus sabias orientaciones durante el desarrollo de la Tesis.
A M.Sc. Adelina del Pilar Meléndez Mejía y Ph.D Humberto Zamora Espitia Profesores asociados de los Departamentos de Farmacia y Química respectivamente por sus valiosos aportes, sabios consejos y evaluación del trabajo.*

RESUMEN

Se evaluó el efecto de factores quimiotácticos en cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (SE) y su posible relación con la variación a la sensibilidad a distintos antibióticos mediante la técnica de Bauer-Kirby en medios de cultivos selectivos y diferenciales, así como de compuestos químicos aislados de plantas (flavonoides). Se encontró que los factores químico-ambientales a los que se expuso *Salmonella* afectaron el perfil de sensibilidad a los antibióticos. Los medios de cultivo Agar SS y Mossel afectaron de forma sinérgica dicho perfil y de forma antagónica lo hicieron SC y ENDO. El efecto sinérgico se evidenció principalmente en los aislados SE-8 y SE-6. Por otra parte, los flavonoides mostraron un efecto antagónico de los antibióticos sobre los aislados SE-1, SE-2, SE-3 y SE-6. Los factores quimiotácticos presentes en los medios afectaron con mayor notoriedad la sensibilidad de antibióticos como Piperacilina-Tazobactam, Kanamicina y Trimetropin-Sulfa. La variación en el perfil de sensibilidad mostró tener una relación con la variación en el perfil de proteínas de membrana analizados por SDS-PAGE.

Palabras clave

Salmonella, factores quimiotácticos, proteínas de la membrana, prueba de sensibilidad microbiana, medios de cultivo.

ABSTRACT

The effect of chemotactic factors in *Salmonella enterica* serotype enteritidis strain and its possible relation with variation to the sensibility to different antibiotics was evaluated using the Bauer-Kirby technique in selective and differential culture media, as well as isolated chemical compounds of plants (flavonoids). The chemical-environmental factors that *Salmonella* was exposed, affected the sensibility profile to the antibiotics. The SS and Mossel Agar culture media synergistically affected the profile and antagonistically did SC and ENDO culture media. The synergistic effect was noticed mainly in samples SE-8 and SE-6. On the other hand, flavonoids showed an antagonistic effect of the antibiotic in samples SE-1, SE-2, SE-3 and SE-6. The chemotactic factors present in the culture media most notably affected the sensibility to antibiotic as Piperacillin-Tazobactam, Kanamycin and Trimethoprim-Sulfamethoxazole. The sensibility profile variation show a relation with the membrane proteins profile variation analyzed by SDS-PAGE.

Key words

Salmonella, chemotactic factors, membrane proteins, microbial sensitivity test, culture media.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	11
MARCO TEÓRICO.....	14
1) Historia y clasificación de <i>Salmonella</i>	14
2) Características biológicas y bioquímicas.....	16
3) Características de la envoltura celular.....	17
4) Epidemiología	18
5) Capacidad adaptativa de las Bacterias a condiciones de estrés	22
6) Mecanismos de acción de los antibióticos	24
7) Resistencia a los Antibióticos.....	25
8) Quimiotaxis Bacteriana	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
JUSTIFICACIÓN	31
OBJETIVOS	33
METODOLOGÍA.....	34
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN Y ANÁLISIS	59
BIBLIOGRAFÍA.....	64

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de <i>Salmonella</i> .	15
Figura 2. Estructura de la pared celular de una bacteria Gram negativa.	18
Figura 3. Incidencia de Salmonelosis en Colombia. 1997 – 2010.	21
Figura 4. Tasa de casos de <i>Salmonella</i> /100.000 habitantes.	22
Figura 5. Sitios de acción de diferentes antibióticos.	25
Figura 6. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos.	27
Figura 7. Cepario de <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>Enteritidis</i> . Medio de cultivo BHI	38
Figura 8. Coloración y morfología celular de las cinco (5) cepas de <i>Salmonella enteritica</i> Serotipo <i>Enteritidis</i> empleadas en el presente estudio.	39
Figura 9. Medios de cultivo selectivos empleados en el presente estudio.	39
Figura 10. Crecimiento de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> , en ENDO Agar.	40
Figura 11. Crecimiento de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> , en Mueller Hinton Agar.	40
Figura 12. Crecimiento de las cepas de <i>Salmonella entérica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> , en medio de cultivo Simons Citrato.	41
Figura 13. Crecimiento de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> , en Agar Salmonella Shigella.	41
Figura 14. Perfil de sensibilidad Original a antibióticos de las diferentes cepas de <i>Salmonella</i> analizadas en el presente estudio.	42
Figura 15. Perfil de sensibilidad a antibióticos de aislados de <i>Salmonella</i> entérica spp.	43
Figura 16. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-1.	46
Figura 17. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-2.	46
Figura 18. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-3.	47
Figura 19. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-6.	47

Figura 20. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-8.....	48
Figura 21. Comparaciones múltiples – Variable Cepa	50
Figura 22. Comparaciones múltiples – Variable Medio o Factor Quimiotáctico	53
Figura 23. Comparaciones múltiples – Variable Antibiótico	55
Figura 24. Perfil de sensibilidad de aislados de <i>Salmonella</i> entérica spp a medicamentos no antibióticos.	56
Figura 25. Perfil electroforético de proteínas de membrana de los diferentes aislados de SE, inducida por estrés fisicoquímico en diferentes medios de cultivo.	58

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Principales estímulos conocidos y tipos de taxis en las bacterias.	28
Tabla 2. Perfil de Sensibilidad a Antibióticos de aislados de SE.....	42
Tabla 3. Efecto de Factores Quimiotácticos sobre el Perfil de Sensibilidad a Antibióticos.....	44
Tabla 4. Análisis de Varianza	48
Tabla 5. Pruebas de los efectos inter-sujetos	49
Tabla 6. Comparaciones múltiples – Variable Cepa.....	50
Tabla 7. Comparaciones múltiples – Variable Medio o Factor Quimiotáctico.....	51
Tabla 8. Comparaciones múltiples – Variable Antibiótico.....	54
Tabla 9. Efecto antimicrobiano de medicamentos no antibióticos sobre aislados de <i>Salmonella Entérica</i>	56

INTRODUCCIÓN

La toxiinfección alimentaria es un problema de salud pública alrededor del mundo, siendo más prevalente en países en vía de desarrollo. Para hacer frente a este problema, han sido establecidas normas sanitarias que permiten efectuar la trazabilidad de la cadena de producción de alimentos y proteger la inocuidad de los mismos para asegurar la salud pública, principalmente de personas susceptibles (niños, ancianos y personas inmunosuprimidas) (Huehn & Malorny, 2009; Brenner et al 2000).

El Centro para el Control y prevención de enfermedades (CDC) ha incluido a bacterias del Género *Salmonella* por la gran morbi-mortalidad en la lista de agentes asociados a bioterrorismo. La amplia variedad de biotipos de *Salmonella* causantes de gastroenteritis llega a más de 2.500, la mayoría implicados en la patología humana y aviar (CDC, 2006 a).

La clasificación de bacterias del género *Salmonella* ha sido difícil debido en parte a la plasticidad genética de este patógeno. No obstante, los análisis genéticos de locus multi-enzimáticos de diferentes cepas permite agrupar a estas bacterias en dos especies: *Salmonella enterica* (*S. enterica*) y *Salmonella bongori* (*S. bongori*). La *S. enterica* puede a su vez, ser dividida en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* (Reeves, M. W. et al 1989). En concordancia con este sistema de clasificación, el nombre más apropiado para denominar *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* corresponde a *S. enterica* subespecie *entérica* biotipo *Enteritidis* y biotipo *Typhimurium* respectivamente. Estos dos patógenos han sido asociados como los principalmente transmitidos a los humanos mediante el consumo de productos derivados de la industria avícola, carne y huevos principalmente. (Rodríguez, D.C et al 1990).

El CDC reporta que el número de Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) vinculadas con *Salmonella enterica* biotipo *Enteritidis* asociadas con el consumo de huevos, incrementó entre 1976 y 1995 de 1.207 aislados (0.6 aislados/100.000 habitantes) a 10.201 en 1995 (4.0/100.000 habitantes). La incidencia de la salmonellosis ha presentado fluctuaciones durante los últimos años, evidenciándose un comportamiento general hacia el aumento de la incidencia (CDC, 2006 b). Adicionalmente, durante los últimos 20 años, los brotes epidémicos de salmonellosis continúan mostrando una

asociación con productos derivados de la industria avícola (Roberts-Witteveen, A.P., et al. 2009, Gantois, I. et al. 2009, 2004, Passaro, et al 1996, Hedberg, et al 1993, St. Louis, et al 1988), estando asociados en un 38% de los casos con el consumo de huevo (Ebel, E.D., et al. 1992, Hedberg, C.W., et al 1993; Gantois I, 2009).

Los reportes de países industrializados muestran que en el Reino Unido han sido reportados 30.000 casos de salmonelosis humana por año, mientras en los Estados Unidos unos 40.000 casos con 0.1% de mortalidad (O'Brien, S. et al 2003, Liebana, E. et al 2001). Durante la década de los años 90 el biotipo más comúnmente aislado y reportado por el CDC como causante de EDA en Estados Unidos fue *Salmonella enterica* biotipo *Enteritidis*, representado un 24.5% de los aislados (CDC, 1996). El costo del tratamiento por salmonelosis humana se encuentra estimado entre \$150 a \$870 millones de dólares anualmente, evidenciando la importancia del control de la salmonelosis como problema de salud pública.

En Colombia el perfil de riesgo de *Salmonella* spp (No tifoideas) desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (INS) en el año 2011, estableció que en el año 2010 el número de casos ascendió a 1.7697 por cada 100.000 habitantes¹. (Ministerio de la Protección Social; UERIA; Instituto Nacional de Salud INS, 2011).

Con el fin de controlar las infecciones por *Salmonella* en animales y mejorar la calidad sanitaria de los alimentos, se ha implementado como medida de control la administración de antibióticos a los animales siguiendo un enfoque profiláctico y terapéutico (Wegener, H. C. 2003, Aarestrup, F. M., et al 2001). Sin embargo, esta medida ha incrementado la aparición de resistencia a antibióticos en muchos patógenos causantes de enfermedades antrozoónicas, incrementando aún más los problemas de salud pública (Sjölund-Karlsson, M., et al 2009; McMahon, M et al 2007; Macovei, L., et al 2006; White, D. G. et al 2002; Gebreyes W.A. et al 2002; Archer, D. L. 1996; Blackburn, C. D et al 1994).

Debido al incremento de la resistencia a los antibióticos en patógenos antrozoónicos, y con el fin de mejorar las condiciones sanitarias de los alimentos

¹ Fuente: Cálculo realizado por el autor tomando los datos emitidos por el Grupo de Microbiología del INS y del Censo realizado en el año 2005, no se incluyeron los datos de *S. Typhi*.

de origen animal, se han desarrollado vacunas vivas atenuadas o muertas para el control de patógenos de importancia en salud animal y humana (Mastroeni, P., et al 2001; Zhang-Barber, L et al 1999; Curtiss, R. et al 1996; Van Oirschot, J. T. 1994). Si bien existen diversas vacunas para el control de la salmonellosis, ésta presenta limitaciones por la existencia de una gran variedad de biotipos que pueden causar infecciones (p.e. *Salmonella enterica* biotipo *Enteritidis* y *typhimurium*), además del hecho de que las bacterinas utilizadas no garantizan el desarrollo de inmunidad cruzada, ni previenen el desarrollo de estados de portador asintomático (De Freitas Neto et al, 2008).

Debido a los antecedentes citados sobre el uso indiscriminado de antibióticos en la agricultura y producción animal, la gran variedad de hospederos a los cuales *Salmonella* se ha adaptado, la adaptabilidad de este patógeno a diferentes ambientes y al uso de diversos esquemas de control con agentes desinfectantes y antibióticos que incrementan la resistencia a antibióticos de este patógeno, se pretende analizar si la composición química del medio ambiente en el cual crezca y se desarrolle la bacteria, puede jugar un papel relevante en el desarrollo de resistencia a los antibióticos.

MARCO TEÓRICO

1) Historia y clasificación de *Salmonella*

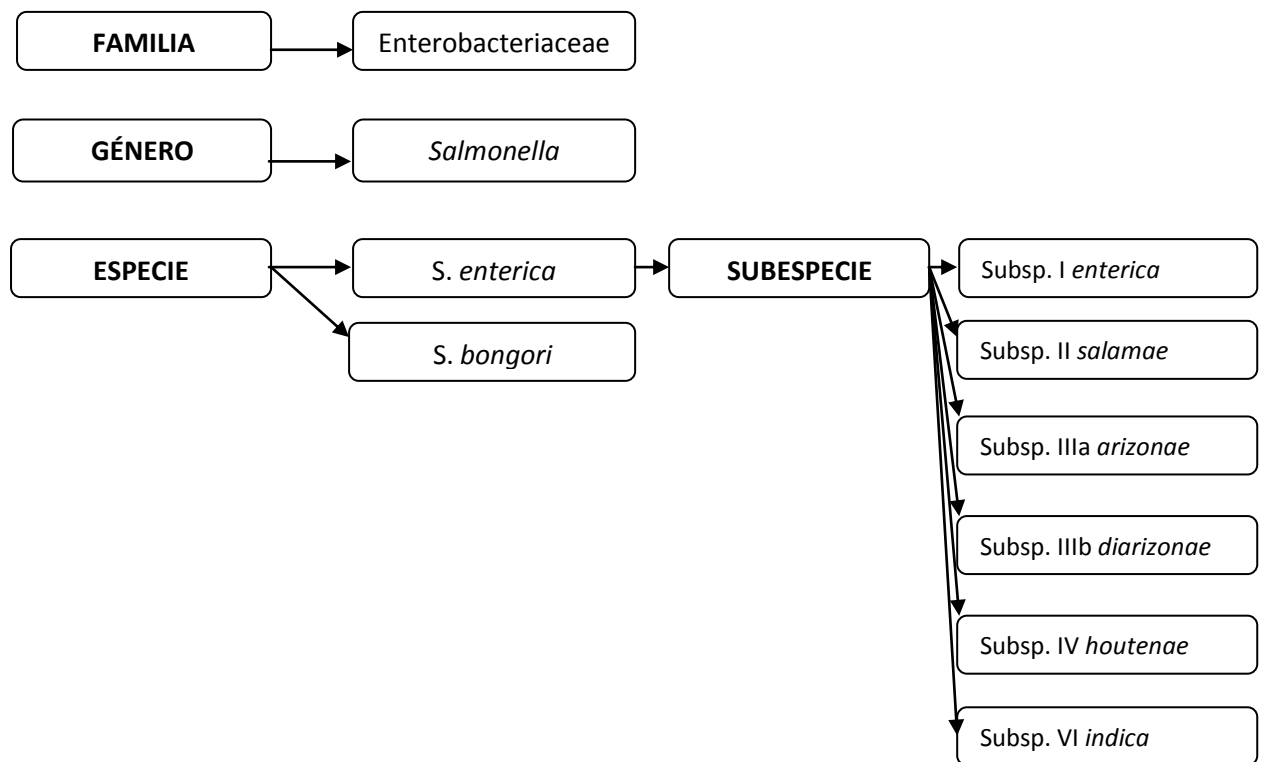
Salmonella fue identificada en 1885 por el Microbiólogo Estadounidense Daniel Elmer Salmon y por Theobald Smith mientras estudiaban una enfermedad denominada “cólera del cerdo”. Dada su identificación en ese tipo de animales, se le concedió en ese entonces el nombre de “Hog-cholero bacillus” (Brands & Alcamo, 2006); Posteriormente, Garterer en 1888, logró cultivar un nuevo serotipo hasta entonces desconocido, el serotipo Enteritidis y en 1892 Loffter aisló el serotipo Typhimurium a partir de ratones que presentaban un cuadro tífico (Scheiber. W., 1987); sin embargo, en 1900 el científico Francés Joseph Léon Lignières sugirió llamarla *Salmonella* en honor a Salmon su descubridor (Brands & Alcamo, 2006).

La nomenclatura para el género *Salmonella* ha evolucionado a partir del concepto de la serotipificación uno-uno inicial propuesta por Kauffmann (Kauffmann, 1930; Kauffmann & Edwards, 1952; Kauffmann, F., 1966) sobre la base de la identificación serológica de antígenos de superficie somáticos (O), flagelares (H) y ocasionalmente capsulares (K).

El desarrollo de la taxonomía de *Salmonella* se produjo en 1973, cuando se demostró por hibridación de ADN que todos los serotipos y subgéneros I, II y IV de la *Salmonella* y todos los serotipos de "Arizona" tenían un alto grado de similitud genética, por lo que pertenecían a una sola especie (Crosa, 1973). La única excepción, fue *S. bongori*, previamente conocida como subespecie V, que por hibridación ADN-ADN pertenecía a una especie distinta (Reeves, 1989).

A raíz de aquellas investigaciones, en la actualidad es mundialmente aceptada la clasificación de este microorganismo en dos especies: *S. enterica*, la cual a su vez se subdivide en 6 subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) y *S. bongori* (Cooke, Threlfall, & Wain, 2007).

Figura 1. Clasificación taxonómica de *Salmonella*.



Los nuevos serotipos se enumeran de acuerdo con las actualizaciones anuales basadas en el esquema de Kauffmann-White, encontrándose que existen más de 2500 serovariedades del género *Salmonella*, cifra que cada vez va en aumento. (Brenner, 2000, Popoff, 2004, CDC, 2006 b). Cerca del 99% de los serotipos identificados pertenecen a *S. entérica*, la cual contiene la mayoría de las serovariedades que son patógenas para los humanos. (Foley & Lynne, 2007).

Los serovares de *Salmonella* han evolucionado y se han adaptado para infectar huéspedes específicos (Kingsley & Baumler, 2000), es el caso de *S. Pollorum* y *Gallinarum* que suelen infectar pollos y gallinas respectivamente, *Abortus-ovis* (corderos), *Abortus-equi* (caballos), *Choleraesuis* (cerdos) y *Dublin* (vacas) (Martinez Alvarez, 2007). Sin embargo, algunos serovares tales como *Typhimurium*, pueden infectar muchas especies incluido el hombre (Callaway T. R, 2008); así mismo, los serotipos *Enteritidis*, *Newport*, *Heidelberg* y *Montevideo* se asocian significativamente con enfermedades en animales y humanos. (Foley & Lynne, 2007). Sin embargo, también es común encontrar que algunos serotipos están solamente presentes en ciertas partes del mundo. (Brands & Alcamo, 2006).

Desde el punto de vista clínico, *Salmonella* puede agruparse en aquellas serovariedades o cepas responsables de generar una enfermedad invasiva sistémica conocida como fiebre tifoidea (incluye a *S. Typhi* y *S. Paratyphi* A, B y C) y *Salmonellas* No Typhi (NTS) que inducen infección localizada y son capaces de inducir gastroenteritis (Cooke, Threlfall, & Wain, 2007), cuyo proceso suele incluir síntomas como dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, y dolor de cabeza (Foley & Lynne, 2007) que puede superarse en pocos días sin dejar secuelas. (Melero, 1994).

2) Características biológicas y bioquímicas

El género *Salmonella* es miembro de la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales*, Clase γ -*Proteobacteria* (Garrity, Bell, & Lilburn, 2004). Son bacterias Gram negativas, aerobias o micro-aerofilas lo cual les brinda la ventaja de vivir y crecer sin oxígeno, aunque preferiblemente lo hacen en ambientes ricos en este compuesto (Brands & Alcamo, 2006); son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum* y algunas variantes inmóviles (Martinez Alvarez, 2007).

El pH óptimo de crecimiento de las *Salmonellas* fluctúa entre 6,6 y 8,2 (Lindner, 1995, Parra M, 2002) aunque puede variar entre 4 a 9, debido a que la tolerancia al ácido depende del tipo de ácido al cual se expone el microorganismo y a factores como la temperatura y sustancias como los nitritos (Lake, Hudson, & Cressey, 2002); el crecimiento en pH inferiores a 4.0 es restringido (Jay, Loessner, & Golden, 2005). Sin embargo existen reportes que han demostrado que *Salmonella* sobrevive durante largos periodos de tiempo en alimentos ácidos. Por ejemplo, han sido detectados microorganismos viables de diversas especies del género *Salmonella* en zumos de manzana, naranja, uva y piña después de 11 - 84 días (Parish, 1997; Oyarzábal, 2003), 19-68 días en yogur (El-Gazzar, 1992), 1 día en salsas para ensaladas (Beuchat, 2006) y 4 semanas en mayonesa (Leuschner, 2001). Estas características hacen de la *Salmonella* un microorganismo de capacidad excepcional para contaminar alimentos, de aquí su importancia como patógeno en la cadena de producción de alimentos.

La actividad de agua de los alimentos (A_w) entendida como la fracción del contenido de humedad total de un producto que está libre para reaccionar o disponible para el

crecimiento de microorganismos también se considera relevante. El número de *Salmonellas* disminuye a medida que disminuye la A_w de los alimentos. *Salmonella* puede multiplicarse en A_w entre 0.94 hasta 0.995 y puede persistir en alimentos con A_w inferiores a 0.94 como chocolate, nueces y mantequilla de maní; los valores bajos de A_w parecen tener un efecto protector sobre *Salmonella* (Lake, Hudson, & Cressey, 2002). En el caso del pollo, dada su A_w no se ve inhibido el crecimiento de *Salmonella* (Ministerio de la Protección Social; UERIA; Instituto Nacional de Salud INS, 2011). En contraste, *Salmonella* es incapaz de tolerar elevadas concentraciones de sal (Lindner, 1995). Es sensible a concentraciones superiores a 9% de cloruro de sodio, aunque puede crecer en productos que contengan 3% de este compuesto (Thomas & Wimpenny, 1996; Jay, Loessner, & Golden, 2005)

3) Características de la envoltura celular

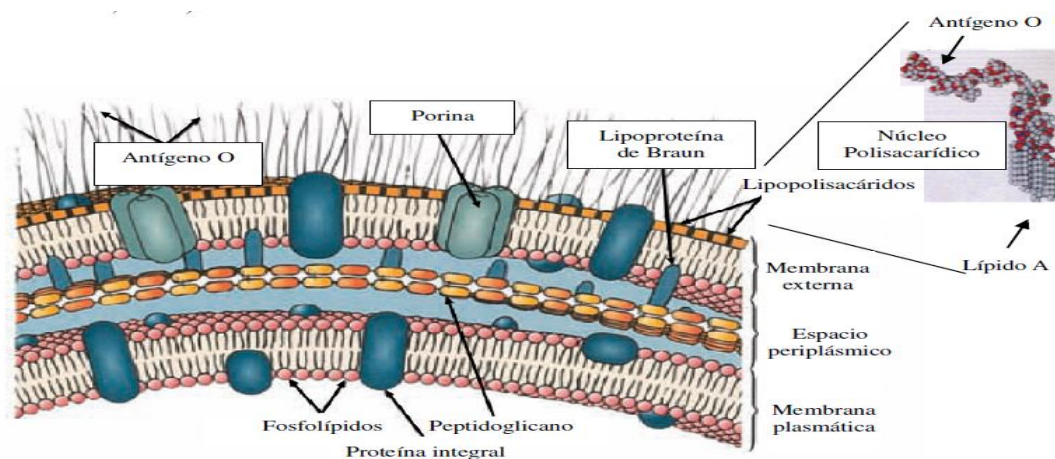
Mientras que bacterias Gram-positivas tienen una envoltura celular de dos capas, la primera conformada por una densa capa externa de peptidoglicano o pared celular y la segunda la membrana citoplasmática, las bacterias Gram-negativas tienen una envoltura celular constituida por tres capas, con una fina pared celular y dos membranas lipídicas concéntricas que confinan el espacio periplásmico que contiene el sáculo de mureína (también llamado peptidoglicano o pared celular) (Tsang Shiu-Wah, 1987). Ambas membranas contienen proteínas que ayudan al paso de materia e información. Sin embargo, tanto la membrana externa como la citoplasmática difieren marcadamente respecto a su composición y función (Koebnik, Locher, & Gelder, 2002). La membrana externa ubica diversas clases de antígenos que son útiles en la clasificación de este tipo de microorganismos y que confieren ciertas características de virulencia al género *Salmonella* (Kauffman, 1960, Tsang Shiu-Wah, 1987, Lindner, 1995).

Los antígenos flagelares o antígenos “H” son proteínas encontradas en la superficie de la bacteria; junto con los antígenos somáticos “O” son responsables de la serotipificación de la *Salmonella*. Muchos serotipos de *Salmonella* pueden alternativamente expresar dos especificidades del antígeno H y son llamados difásicos, y pocos serotipos como *S. Enteritidis* y *S. Typhi* producen solo una clase de antígeno flagelar y son llamados monofásicos (Tsang Shiu-Wah, 1987). Las *Fimbrias* o *Pili*, útiles en su clasificación, algunas de ellas, ya identificadas con precisión, parecen

estar relacionadas con la capacidad infectiva del género *Salmonella*. Dentro de las más estudiadas se encuentran SEF14, SEF17, SEF18, SEF21, fimbrias particulares de *S. Enteritidis*. (Lindner, 1995, Thorns, 1995)

En términos generales, alrededor del 50% de la masa de la membrana externa se compone de proteínas, ya sea en forma de proteínas integrales o como lipoproteínas, estas últimas ancladas a la membrana por medio del enlace N-terminal a los lípidos; concediendo características estructurales particulares que confieren sus propiedades a la fisiología de la membrana. Dentro de las más estudiadas por su importancia se encuentran: OmpA, OmpX, fosfolipasa A, porinas generales (OmpF, PhoE), porinas sustrato-específicas (LamB, ScrY) y transportadores hierro-sideróforos (FhuA y FEPA). (Koebnik, Locher, & Gelder, 2002).

Figura 2. Estructura de la pared celular de una bacteria Gram negativa. Tomado de: Martínez Alvarez, 2007.



4) Epidemiología

Salmonella entérica ha sido una de las subespecies más descritas, comprendiendo alrededor de 2.500 serovariedades, capaces de colonizar el tracto intestinal de la mayoría de mamíferos. Esta bacteria es la principal causante de gastroenteritis por intoxicación con alimentos, así como de bacteremia en niños, ancianos y personas inmunosuprimidas alrededor del mundo (Brenner, 2000). A su vez, los serotipos *Enteritidis* y *Typhimurium* han sido identificados como los principales causantes de salmonelosis en humanos, principalmente en niños y ancianos.

La salmonelosis produce un gran número de brotes epidémicos en el mundo anualmente con un porcentaje de mortalidad relacionado con el serotipo infectante. La fiebre tifoidea desarrollada por la infección con *S. enterica* serotipo *Typhi* afecta 16 millones de personas con mortalidad de 600.000 individuos anualmente alrededor del mundo, principalmente en países en vía de desarrollo (WHO, 2002). *Salmonella* afecta en Estados Unidos y el Reino Unido aproximadamente entre 1 y 2 millones de personas, produciendo entre 40.000 y 30.000 brotes epidémicos con mortalidad entre el 1 y 3.6%, generando gastos por tratamiento médico superiores a 2 billones de dólares (CDC 2000). La Organización Mundial de la Salud ha podido establecer que la enfermedad causada por la *Salmonella* es una infección común que afecta a más de 3 mil millones de personas y provoca 200.000 muertes cada año, pudiendo aparecer como fiebre tifoidea, gastroenteritis, bacteriemia o infección focal extraintestinal. (Huehn & Malorny, 2009).

En los últimos años el serotipo *Enteritidis* ha incrementado su incidencia, sobre el *Typhimurium*, lo cual se ve reflejado en una disminución de la severidad de la gastroenteritis y en el número de casos reportados, aunque no necesariamente se correlaciona con una disminución de la infección animal por control sanitario (Rabsch, 2001). El incremento en la carga microbiana del medio ambiente y la colonización del animal es favorecida por la producción intensiva de animales.

El Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) estima que alrededor de 400 personas mueren cada año a causa de salmonelosis aguda (CDC, 2012, Brands & Alcamo, 2006, Huehn & Malorny, 2009). Los síntomas típicos de la gastroenteritis se desarrollan dentro de las 6 a 72 horas después de la ingestión de alimentos contaminados con las bacterias (CDC, 2001) que son resueltos en 7 días o de 3 a 20 días, dependiendo de variables relacionadas con la edad, estado inmunológico y concentración de microorganismo. Las personas más propensas a contraer salmonelosis son los niños menores de cinco años, los ancianos y los inmunocomprometidos (CDC, 2012). En países con periodo de estación como los ubicados en el hemisferio norte, la incidencia de *Salmonella* incrementa en primavera-verano (Haley, Cole, & Lipp, 2009). Considerando el factor climático, se puede afirmar en los países ubicados en la zona tórrida con foto periodo anual constante, presentan mayor incidencia de casos de gastroenteritis.

La infección humana se asocia principalmente a la ingesta de agua o alimentos contaminados con *Salmonella*, de éstos los más relacionados con brotes epidémicos de salmonellosis son los productos derivados de la industria avícola (carne y huevos), carne de vaca y cerdo y productos lácteos. Sin embargo, la transmisión oral-fecal entre humanos también puede ocurrir, así como por contacto con animales portadores asintomáticos. Dentro de estos, los bovinos, ovinos, porcinos, aves de corral y productos derivados de su explotación comercial son responsables directos de la enfermedad en humanos. La Agencia de Alimentos y Medicamentos o Food and Drug Administration (FDA), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), resaltan que la contaminación microbiana puede ocurrir durante cualquiera de los pasos de la cadena productiva (producción, cosecha, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercio y manejo en el hogar) y puede provenir de factores ambientales, animales o humanos.

En el caso de Colombia, las entidades de vigilancia y control (Ministerio de Protección Social, INS e INVIMA) han adoptado medidas sanitarias para la importación de productos y subproductos cárnicos de la especie bovina, definiendo los requisitos sanitarios necesarios para prevenir la introducción de Encefalopatía Espongiforme Bovina, de acuerdo con lo establecido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE); así como la condición de estar libre de Peste Bovina, Fiebre del Valle de Rift, Fiebre Aftosa, y que tanto la carne como los productos cárnicos, sean objeto de un control sanitario oficial, hacen parte de los controles. (Instituto Colombiano Agropecuario ICA, 2010).

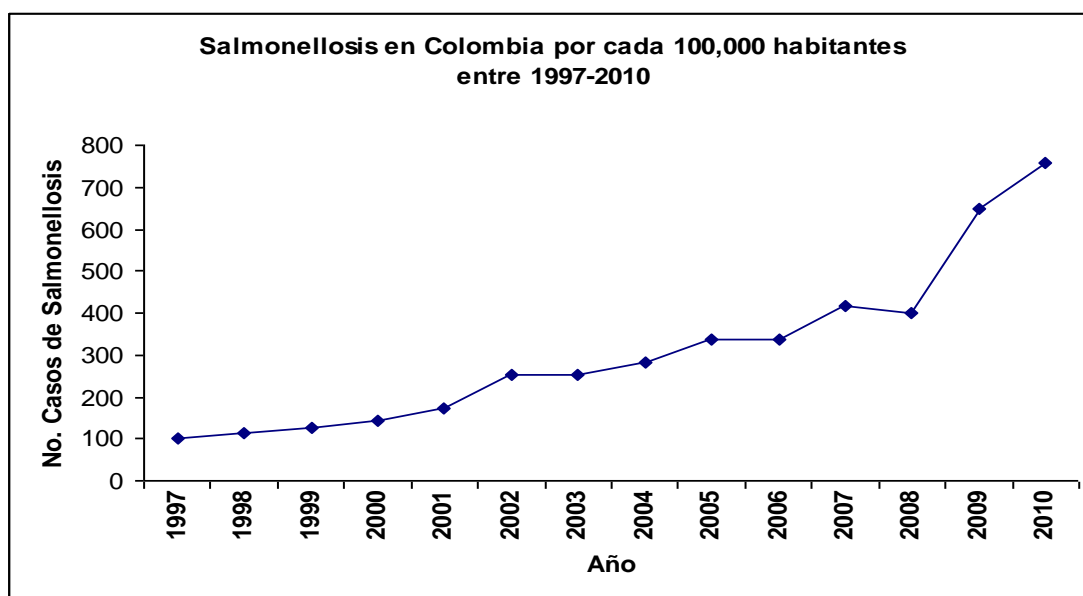
De acuerdo con estadísticas presentadas en boletines epidemiológicos del Instituto Nacional de Salud, en Colombia la salmonellosis muestra un comportamiento variable durante el periodo 1997-2005. Para 1997 el serotipo predominante en aislados fue *S. enterica* (SE) serotipo *Enteritidis*. (64%), seguido del serotipo *Typhimurium* (27%); luego en 2003, se incrementó notablemente el número de aislamientos de *S. Typhimurium* (43.5%) con una reducción del serotipo *Enteritidis* (17.7%) y posteriormente, ambos serotipos alcanzaron porcentajes similares en el año 2005 (34.8% y 33.3% respectivamente). Para el caso de *Salmonella enterica* serotipo *Typhi* la relación fue directa mostrando un incremento paulatino durante este periodo de 1 a 13%.

En términos generales, mientras el número de aislamiento de *Salmonella entérica* serotipo *Enteritidis* ha conservado un comportamiento casi uniforme en el número de aislamientos evidenciados entre 1998 y 2005, durante ese mismo periodo se observó un incremento notorio en el número de aislamientos de SE *Typhimurium* y *Typhi*, lo cual indica cambios epidemiológicos de la enfermedad, tal vez debido a los métodos de control ejercidos para SE serotipo *Enteritidis*. Durante ese periodo se obtuvieron 1807 aislados, de los cuales el de mayor resistencia a antibióticos fue el observado para SE serotipo *Typhimurium* con alta resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, trimetropin sulfá y ampicilina (Instituto Nacional de Salud - INS, 2005).

Para el año 2011, el Instituto Nacional de Salud estableció un perfil de riesgo de *Salmonella spp* (No tifoideas) calculando el número de casos de Salmonelosis por cada 100.000 habitantes con base en el reporte del Grupo de Microbiología del INS y con la cifra de la población del Censo del 2005, encontrando que la incidencia va en aumento posiblemente por la mejora en la notificación de casos.

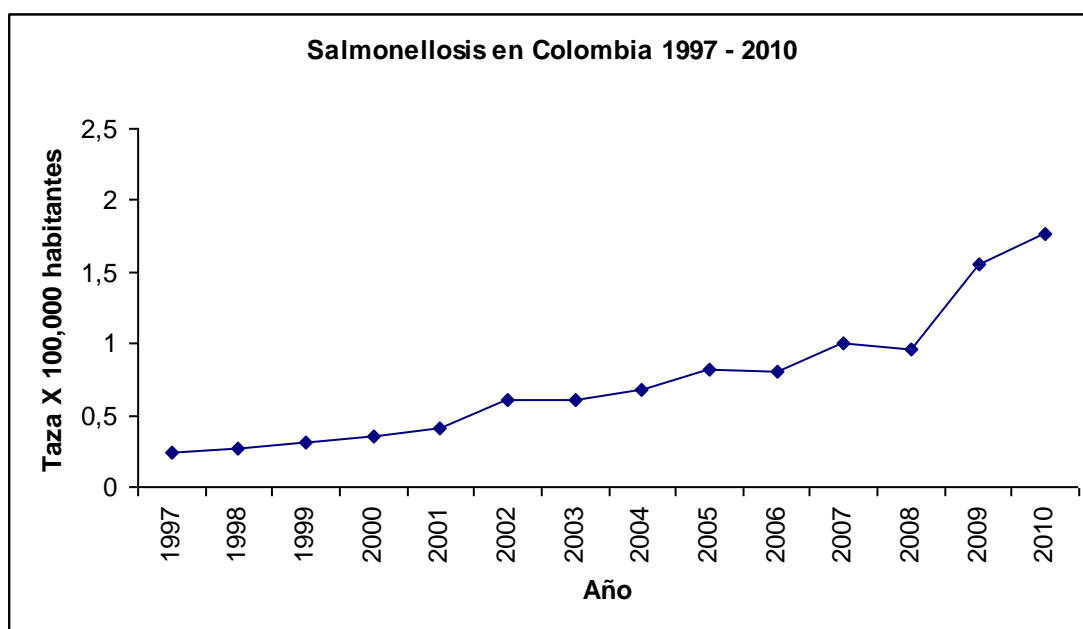
Sin embargo, debido a que los cuadros de gastroenteritis asociados a *Salmonella* en la población son de sintomatología leve en adultos, con resolución entre las 24 y 48 horas, característica que la diferencia de los casos de gastroenteritis asociados con *Escherichia coli*, la epidemiología de la salmonelosis en Colombia es una patología con reporte negligente.

Figura 3. Incidencia de Salmonelosis en Colombia. 1997 – 2010. Tomado de: Ministerio de la Protección Social; UERIA; Instituto Nacional de Salud INS, 2011.



Al comparar la incidencia con información de otros países, ésta se encuentra por debajo de la media mundial, posiblemente por el sub-registro en el sistema de salud. Adicionalmente, dado que los datos reportados por el INS son anuales no es posible establecer si existen picos epidemiológicos relacionados con las estaciones. (Ministerio de la Protección Social; UERIA; Instituto Nacional de Salud INS, 2011)

Figura 4. Tasa de casos de *Salmonella*/100.000 habitantes. Tomado de: Ministerio de la Protección Social; UERIA; Instituto Nacional de Salud INS, 2011.



5) Capacidad adaptativa de las Bacterias a condiciones de estrés

La capacidad de adaptación de todo ser vivo frente al medio ambiente es ejercida por sensores (receptores) ubicados en la membrana celular, cuya función es determinar la variación de parámetros físicos y químicos del medio, e informar mediante señales químicas a la célula el tipo de respuesta que debe ejercer para compensar dicha variación. La respuesta de adaptación está determinada por la expresión de genes específicos. Adicionalmente, ha sido sugerido que la presión del medio ambiente puede ser un factor determinante en la adquisición de características de resistencia al estrés (Alvarez Ordoñez, 2009).

Así mismo, el estrés nutricional de un microorganismo como es el origen de la fuente de nitrógeno puede modificar la resistencia a pH ácido por parte de los microorganismos. Un ejemplo de esto, es que la inclusión en el medio de tratamiento

de arginina, lisina y ácido glutámico incrementa la supervivencia de *Escherichia coli* en condiciones ácidas extremas (Castaine-Cornet, 1999; Castaine-Cornet M. a., 2001). En el caso de *Salmonella* el efecto protector a la exposición a pH ácido es más selectiva (Park, 1996; Kieboom, 2006). Los trabajos de Park y col. demostraron que *S. Typhimurium* adaptadas a pH 4,4 durante 1 hora, incrementan a pH 3,0 solo cuando el cultivo contenía lisina.

La contaminación de diversos alimentos por enterobacterias y la diversidad de fuentes de carbono y nitrógeno en estos, es una condición que favorece la expresión de genes asociados con la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir bajo diferentes condiciones de estrés tanto físico como químico, que pueden tener relevancia en la industria de alimentos. Además, el uso de agentes preservantes y desinfectantes han sido asociados con incremento en la capacidad de resistencia los antibióticos (Van Schaik, 2005). Esta característica es de vital importancia en la cadena de producción de alimentos, ya que puede inducir la selección de microorganismos con mayor capacidad patogénica (Hill, 2002).

6) Mecanismos de acción de los antibióticos

Según la FAO, los agentes antimicrobianos actúan a través de una serie de mecanismos diferentes, cuyos blancos se encuentran en distintas regiones de la célula atacada, como se describe a continuación (FAO, 2004):

- Pared bacteriana
- Membrana bacteriana
- Síntesis de proteínas
- Síntesis de ácidos nucleicos

En cuanto a los antibióticos que ejercen su efecto por alteración del proceso de síntesis de la pared bacteriana, se tiene a los β -lactámicos, glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina), bacitracina y estreptograminas (virginiamicina, quinupristina-dalfopristina) quienes interfieren en la síntesis de peptidoglicano, el elemento constitutivo de la pared, provocando la lisis bacteriana.

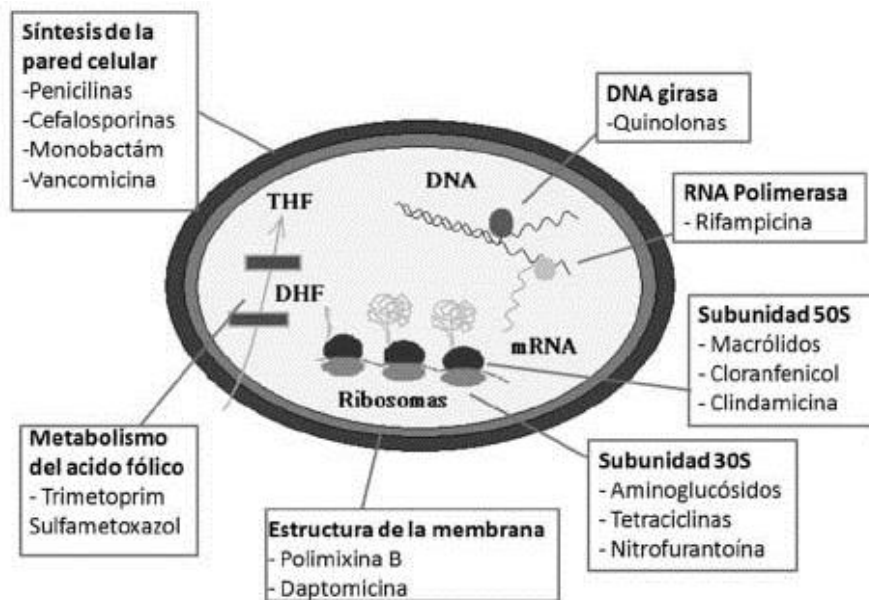
Dentro del grupo de antimicrobianos que alteran la función de membrana se encuentran las polimixinas (polimixina B y colistín). Estos, son péptidos catiónicos con actividad de tipo detergente que crean distorsión de la fracción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram negativas, induciendo la muerte celular.

A nivel de la síntesis de proteínas, un blanco de acción es la estructura del ribosoma. A este grupo de antibióticos pertenecen los aminoglucósidos y aminociclitolos, tetraciclinas, cloranfenicol, lincosamidas y macrólidos, los cuales interfieren con la síntesis de proteínas. Los aminoglucósidos y aminociclitolos actúan a nivel de la porción 30S del ribosoma, induciendo errores en la lectura de la información aportada por el ARN mensajero. Las tetraciclinas, por su parte, también se unen al ribosoma en la porción 30S, en forma similar a lo que ocurre con los aminoglucósidos. El Cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol, actúan a nivel de la porción 50S del ribosoma, inhibiendo la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos. Las lincosamidas y macrólidos, también se unen a la porción 50S, inhibiendo la translocación. Todos estos mecanismos, de una u otra manera, detienen o desvían la síntesis de proteínas por parte de las bacterias.

Finalmente, el último blanco de la acción de los antibióticos es el DNA. Los agentes que actúan a nivel de los ácidos nucleicos son varios y sus sitios de acción diversos. Entre ellos se encuentran las sulfamidas y trimetoprima cuya acción como antimetabolitos impide la síntesis de purinas y los distingue del resto. Las fluoroquinolonas y novobiocina actúan a nivel de las cadenas de ADN; los nitroimidazoles, como dimetridazol, metronidazol y timidazol dan lugar a la disrupción de las cadenas de ADN, impidiendo su reparación. Los nitrofuranos, por su parte impiden la lectura de codones ADN-ARN mensajero.

El resumen los antibióticos más comúnmente utilizados, así como sus lugares de acción se presentan a continuación:

Figura 5. Sitios de acción de diferentes antibióticos. *Tomado de:* Tafur JD, 2008.



7) Resistencia a los Antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los ejemplos mejor conocidos de adaptación rápida de las bacterias a un ecosistema que contenga estas moléculas (Martinez Alvarez, 2007).

Es así como el uso indiscriminado de antibióticos en agricultura, producción, y en la salud tanto animal como humana, ha ejercido una presión ambiental sobre los

microorganismos durante los últimos años, condición que ha estimulado la aparición de cepas de microorganismos de alta resistencia. El mayor problema de la utilización de antibióticos en el campo agrícola, es la flora microbiana compartida entre animales y humanos (WHO, 2002).

De igual forma, ha sido reportado que el uso indebido de antibióticos en la producción animal intensiva incide para que la resistencia bacteriana se haya incrementado a un ritmo alarmante y es factible que continúe aumentando si no se realiza un debido control de antibióticos o de agentes antimicrobianos. Durante los últimos años se ha puesto en evidencia que las cepas de *Salmonella* han desarrollado resistencia a varios antibióticos, circunstancia que dificulta su control.

En el caso de la salmonellosis ha sido identificada una cepa *S. enterica* serotipo *Typhimurium* resistente a un amplio rango de antibióticos, dentro de los cuales se encuentran: ampicilina, estreptomicina, tetraciclina. Esta cepa de *Salmonella* fue denominada *S. Typhimurium* R-type ACSSUT y ha sido aislada de trabajadores de granjas, algunos mamíferos, aves y mascotas domésticas (WHO, 2002). Además, los aislados de *Salmonella* procedente de aves y de humanos, presentan sensibilidad a Imipenem, mientras que el mayor porcentaje de resistencia se observó frente a sulfametaxazol-trimetoprim y Gentamicina (OPS, USAID, HDM,CD, 2009).

El Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana (NARMS) indicó que el 22,5% de cepas de *Salmonella* no *typhi* de seres humanos fueron resistentes a por lo menos un agente antimicrobiano, lo cual representó una disminución del 33,8% detectado en 1996 (FDA, 2006). El fenotipo de resistencia a múltiples fármacos más comúnmente publicado fue a la ampicilina, chloramphenicol, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclinas (ACSSuT), que se detectó en 9,3% de los aislados ensayados. (Foley & Lynne, 2007).

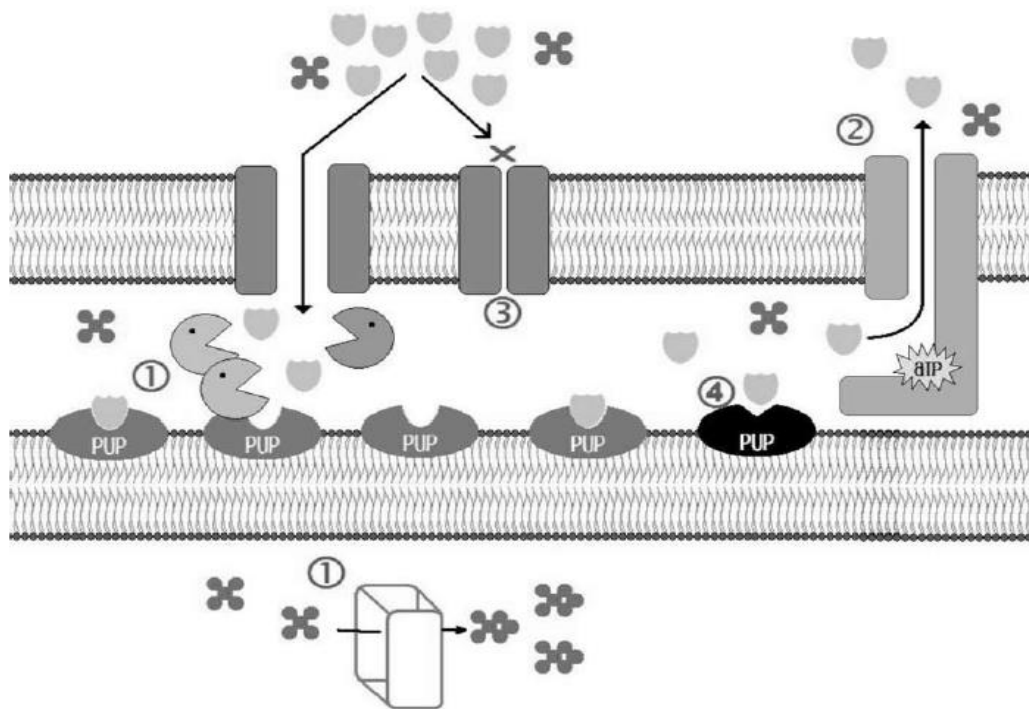
En Colombia, el 56% de los aislados muestra resistencia a un antibiótico y el 22% multiresistencia, principalmente a antibióticos como tetraciclina, trimetropin sulfametoxazol y ampicilina (OPS, USAID, HDM,CD, 2009), de las cuales, las tetraciclinas y trimetropin sulfametoxazol son de uso común en la práctica veterinaria.

7.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos:

Dentro de los mecanismos de resistencia descritos en la figura 6, se encuentran aquellos específicos como el ejercido por enzimas que modifican la estructura del antibiótico, siendo los más conocidos las β -lactamasas, (Tafur JD, 2008; CDC, 2006), las fosfatasas, las sulfatasas y las acetilasas (Foley & Lynne, 2007). La primera de estas ejerce su efecto únicamente sobre antibióticos de las familias de la penicilina, cefalosporina y carbapenems; las enzimas restantes actúan indistintamente sobre la mayoría de las familias de antibióticos.

Adicionalmente, existen mecanismos genéricos de resistencia a los antibióticos dentro de los cuales se encuentra la alteración de la permeabilidad por incremento del número de moléculas de lipo-polisacárido (LPS), principalmente en bacterias gram negativas, disminuyendo la absorción por desregulación de transportadores de membrana y activando el mecanismo de bomba de eflujo (Tafur JD, 2008).

Figura 6. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. (1) Enzimas modificadoras, (2) Bombas de expulsión, (3) Cierre de porinas, (4) Proteínas de Unión a penicilina (PUP). Tomado de: Tafur JD, 2008.



8) Quimiotaxis Bacteriana

Las bacterias no se encuentran en el medio sin rumbo alguno, sino que son atraídas por nutrientes tales como azúcares y aminoácidos y son repelidas por muchas sustancias nocivas y productos de desecho, pudiendo también ser estimuladas por otros factores medioambientales como temperatura, luz, gravedad, etc., lo cual representa una gran ventaja adaptativa para las bacterias. El estudio de la quimiotaxis positiva y/o negativa pueden ser analizada con cultivos en placa de Petri. Si las bacterias se colocan en el centro de una placa de agar que contiene un atrayente, las bacterias agotarán el suministro local, generando un anillo de expansión de bacterias; mientras que cuando se coloca un repelente, las bacterias suelen lejarse del mismo, creando una zona clara alrededor de la placa. (Prescott, Harley, & Klein, 1999)

La quimiotaxis es un mecanismo por el cual la bacteria responde eficientemente y rápidamente a cambios en la composición química en su ambiente. La quimiotaxis al igual que otras taxis permite a la bacteria acercarse y permanecer en ambientes favorables y escapar de los hostiles. A continuación se describen los principales estímulos conocidos y tipos de taxis en las bacterias. (Galicia, Sandoval, Rojas, & Magaña, 2011)

Tabla 1. Principales estímulos conocidos y tipos de taxis en las bacterias. Tomado de Galicia, Sandoval, Rojas, & Magaña, 2011.

ESTÍMULO	TIPO DE TAXIS
Oxígeno	Aerotaxis
Luz	Fototaxi
Altas concentraciones de sal o azúcar	Osmotaxi
Químico	Quimiotaxi
Temperatura	Termotaxi

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La alta plasticidad genética de *S. enterica*, el carácter ubiquitario y los múltiples reservorios naturales, hacen que el control de este microorganismo no sea el más eficiente (Altekruse, S. 1993, Baumler, 1997; Hensel, 2004; Dorman, 2005).

De otro lado, debido a la gran capacidad adaptativa de esta bacteria y sus múltiples hospederos, incluyendo aves, los cuales en la práctica común de levante de animales de renta son sometidos de manera indiscriminada al uso de antibióticos como factor de crecimiento y profilaxis, favoreciendo así la resistencia antimicrobiana. A esto debe sumarse que en Colombia no existe un reporte claro acerca del biotipo circulante, pero dada la importación de animales y productos de la industria avícola desde los Estados Unidos, se podría inferir que el fagotipo o fagotipos circulantes sean muy parecidos.

En Colombia, se adelantó una evaluación de la eficacia de las bacterinas utilizadas para el control de la salmonelosis, que estudió la inmunidad humoral inducida por las vacunas, y tras utilizar 18 aislados aviares de *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* Colombianos, puso en manifiesto la existencia de variación antigénica a nivel de componentes de la envoltura bacteriana entre los diferentes aislados. Además, evaluó la calidad de anticuerpos inducidos por bacterinas comerciales utilizadas en Colombia para control de la salmonelosis aviar, empleando como herramienta el Western-Blott. Este trabajo demostró que el perfil de antígenos reconocidos por anticuerpos generados en aves inmunizadas con dos bacterinas comerciales utilizadas en avicultura, no es superponible, es decir, no ofrece la misma protección (Crosby M. 1997; Crosby M. 1998; Wyant, T.L. 1999, McSorley, S.J. 2002, Strindelius, L., 2002;). Esta situación conduce al desarrollo de infección crónica sintomática en animales e incrementa la excreción de este patógeno al medio ambiente.

A nivel epidemiológico, los datos en el país entre 1997 y 1999 reportaron 976 aislamientos de *Salmonella spp.*, de los cuales el 96% fue causante de Enfermedad Diarreica Aguda, el 34% correspondió a *Salmonella spp*, el 39% al serotipo *Enteritidis*, el 27% a *Typhimurium* y el 5% a *S. typhi*. Para el año 2002 y 2004 de los 2330 casos reportados por el sistema de vigilancia en salud pública (SIVIGILA) tan solo fueron confirmados el 3.7% de los aislados. Estos datos, son preocupantes para un país en vías de desarrollo, con menor infraestructura para control de patógenos de origen alimentario con respecto a un país industrializado.

En Colombia además del papel de reporte epidemiológico de casos de Salmonelosis por parte del INS como centro de referencia a nivel nacional, realizando la caracterización genética de aislados mediante técnicas de biología molecular, no se desarrollan proyectos de investigación básica encaminados a la comprensión de los factores asociados al incremento de la resistencia antimicrobiana. Estos trabajos arrojarían evidencias que podrían ser útiles en el control eficiente del incremento de la resistencia a los antibióticos, reduciendo los gastos en salud pública.

JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud ha establecido que la infección causada por Salmonelosis es una patología común que afecta a más de 3 mil millones de personas y provoca 200.000 muertes cada año. Puede aparecer como fiebre tifoidea, gastroenteritis, bacteriemia o infección focal extraintestinal. (Huehn & Malorny, 2009). La gastroenteritis es la forma de mayor frecuencia en países en vía de desarrollo, en los cuales la población infantil es la más vulnerable, debido entre otros factores a condiciones de desnutrición y la existencia de una deficiente red de alcantarillado; circunstancias que hacen de la Salmonelosis una de las principales causas de muerte infantil a nivel mundial.

Adicionalmente, de acuerdo con el CDC, en países desarrollados los brotes epidémicos causados por *Salmonella* se incrementan durante el periodo verano-otoño, lo cual parece tener relación con las óptimas condiciones climatológicas para el desarrollo y crecimiento de la misma. Estas condiciones predominan en la mayoría de países en vías de desarrollo durante la mayor parte del año, favoreciendo la multiplicación de los microorganismos y por consiguiente de la *Salmonella*. De aquí la gran capacidad de este microorganismos para contaminar diversos tipos de alimentos en el medio ambiente.

A nivel epidemiológico es bien sabido que un porcentaje significativo de casos de salmonelosis es causado por el consumo de productos derivados de la industria avícola, principalmente huevos y carne de aves crudos o parcialmente cocidos, lo cual tiene repercusiones económicas tanto en los sistemas de salud como para la industria agroalimentaria. Los productos derivados de este sector representan el 40% de la producción animal en el mundo. Además, Colombia importa más de diez toneladas de productos derivados de la industria avícola de países como Ecuador y Perú, países que poseen legislaciones laxas para el control de salmonelosis, lo cual puede incrementar el riesgo biológico en nuestro país. (Ministerio de la Protección Social; UERIA; Instituto Nacional de Salud INS, 2011).

En Colombia la instancia que vela por proteger y promover la salud de la población mediante la vigilancia sanitaria de los alimentos es el INVIMA², el cual tiene la capacidad técnica para la realización de análisis rutinarios básicos, pero limitada cobertura y poca disponibilidad de pruebas específicas.

El actual trabajo propone una metodología secuencial encaminada a la identificación de factores asociados al incremento o variación en la sensibilidad a los antibióticos en aislados de bacterias pertenecientes al género *Salmonella* obtenidos a partir de muestras de superficie de planta de sacrificio. Los resultados de este trabajo podrían tener utilidad en el mejoramiento del uso de antibióticos en producción animal a través de la comprensión del desarrollo de mecanismos genéricos de resistencia a los antibióticos, que no implican directamente ganancia o pérdida de información genética.

² Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamento y Alimentos

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la presencia y/o variación de componentes de la envoltura celular de aislados de *Salmonella entérica* biotipo *Enteritidis* circulantes en Colombia y su relación con el desarrollo de resistencia o sensibilidad a los antibióticos inducida por factores quimiotácticos.

ESPECÍFICOS

1. Recolectar, aislar y caracterizar especímenes de *Salmonella entérica* serotipo *Enteritidis* del medio ambiente en diferentes medios de cultivo selectivos.
2. Determinar los perfiles de sensibilidad a antibióticos de cada uno de los aislados seleccionados.
3. Crecer los aislados de *S. entérica* en medios de cultivo con diferente efecto quimiotáctico.
4. Determinar la presencia de variación en la expresión de componentes de la envoltura celular por electroforesis (SDS-PAGE) de los aislados crecidos bajo condiciones de estrés.
5. Establecer los perfiles de sensibilidad a los antibióticos de los aislados crecidos bajo diferentes condiciones.

METODOLOGÍA

1) Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron recolectados de muestras de superficie de plantas de beneficio, utilizando hisopos de algodón estériles impregnados con solución salina. Originalmente las bacterias fueron mantenidas en medio BHI y posteriormente el cultivo de las muestras se realizó en medio de cultivo Simons Citrato y Agar *Salmonella-Shigella*. Los cultivos con crecimiento característico fueron analizados por microscopía de luz y tinción de Gram y las colonias correspondientes fueron recultivadas en medios de cultivo selectivos como garantía de pureza de cada uno de éstos.

2) Microorganismos crecidos bajo condiciones de estrés

Los microorganismos seleccionados y caracterizados por microscopía y pruebas bioquímicas, fueron crecidos bajo diversas condiciones de estrés, utilizando cajas de Petri y medios de cultivo selectivo y diferencial (ENDO, Simons Citrato, *Salmonella-Shigella*, Mossel, Muller Hinton). Estos microorganismos fueron cosechados a las 24 horas y recosechados en estos medios por triplicado para determinar el perfil de sensibilidad a los antibióticos posterior al estrés causado por los inhibidores de crecimiento presentes los respectivos medios de cultivo.

3) Perfil de sensibilidad a los antibióticos

La sensibilidad de los diferentes aislados de microorganismos del género *Salmonella* fue determinada por la técnica de Bauer A.W & Kirby W.M, (1966). De los cultivos en medio Muller Hinton (MH) calibrados a una D.O correspondiente a 0.5 de la escala de McFarland, se adicionó 0.1 ml de cada uno los microorganismos sobre la superficie de placas de agar conteniendo medio Mueller Hinton y extendiendo con la ayuda de una asa Drigalsky. El medio de cultivo fue preparado siguiendo las indicaciones de la casa manufacturera (descritas previamente), esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos y mantenido luego en baño de maría hasta lograr una temperatura de 48-

50°C. El medio se distribuyó en cantidad uniforme (20ml) en cajas de Petri estériles, evitando la formación de gotas de agua en la superficie por condensación.

Una vez absorbido el exceso de humedad del medio de cultivo se colocaron los diferentes sensidiscos de antibiótico y las placas fueron cultivadas a 35 +/- 2 °C por un periodo de 24 horas.

Los sensidiscos utilizados para determinar la sensibilidad de los microorganismos en este proyecto fueron adquiridos con la casa comercial Difco (Ampicilina 10µg, Ampicilina/Sulbactam 20µg, Ciprofloxacina 5µg, Kanamicina 30µg, Acido Nalidixico 30µg, Piperacilina 100µg /Tazobactam 10µg y Sulfamethoxazole 23.75 µg/ Trimetropin 1.25 µg)

Los halos de inhibición para cada uno de los antibióticos seleccionados fueron tomados con la ayuda de un calibrador o regla con escala milimétrica y la interpretación de los resultados siguió la normativa estándar para esta técnica (≤ 11 mm Resistente; ≥ 19 Sensible).

4) Efecto de flavonoides sobre el perfil de sensibilidad

Además del estrés causado por los medios de cultivo selectivos y diferenciales, se incluyó en el medio de cultivo extractos de productos naturales enriquecidos en flavonoides, tales como Quercetina, Rutina y fracciones obtenidos de plantas de la familia *rutaceae* y *lauraceae*, los cuales ensayados con anterioridad no presentaron efecto antimicrobiano.

Los flavonoides fueron incluidos en agar Muller Hinton a concentración de 125 µg/mL, realizando el análisis de sensibilidad de forma similar a la descrita en el aparte anterior.

5) Aislamiento de envolturas de *S. entérica*

Cada uno de los aislados, cultivado independientemente en medios de cultivo selectivo y diferencial, de forma similar a lo descrito en el numeral (2), fue sometido a proceso de lisis osmótica. Resumiendo, las bacterias sometidas a estrés osmótico en búfer TBS 50 mM, glucosa 60%, EDTA 0.1%, lisozima 50 mg/ml, por 30 min. y diluidos 1/5

con agua destilada e incubación en esta solución por 1 hora. Posteriormente las bacterias fueron sometidas a cinco ciclos de sonicación en baño de hielo. La mezcla fue sometida a centrifugación (3.000 rpm) por 10 min, y el pellet fue descartado. Finalmente, el sobrenadante lavado y sonificado una vez más fue sometido a centrifugación a 30.000 rpm por 1 hora. La proteína total fue determinada por el método de Biuret para proteína total (Ibrahim, G.F. 1985).

6) Análisis antigénico por SDS-PAGE

Para este análisis se utilizó la técnica de electroforesis SDS-PAGE en sistema discontinuo clásico, con el fin de determinar diferencias en el perfil electroforético de proteínas de membrana o antígenos de superficie de los diferentes aislados utilizando tinción simple de azul de Coomassie (Tsai, C.M.1982). La cantidad de proteína total adicionada por carril para cada uno de los aislados, de acuerdo al cálculo obtenido por el método de Biuret fue 100 µg por carril, teniendo en cuenta que la sensibilidad de la tinción con azul de Coomassie aproximada era 5µg por banda y se esperaban observar entre 10 – 20 bandas de proteína. La preparación de la cámara vertical para la electroforesis se llevó a cabo bajo el siguiente protocolo (Zamora, 2012): El gel de concentración utilizado para tal fin contuvo una mezcla acrilamida-bis-acrilamida 7% a pH 6.8 y el de resolución 12.5% a pH 9.2. El gel fue corrido a 75 Vol., por 30 min., incrementando el voltaje a 150 Vol., hasta alcanzar una distancia de 0.5 cm del borde inferior del gel. El tiempo de polimerización promedio para el gel de poliacrilamida fue de 20 min.

7) Eliminación de material residual

Los patógenos bacterianos como el Género *Salmonella* se encuentran clasificados en nivel de bioseguridad II, es decir de riesgo intermedio en potencial para ser transmitidos a humanos y animales (NO transmitidos por vía aérea) bajo experimentación *in-vitro*.

Este tipo de patógeno es transmitido al animal por contacto directo, vía fecal-oral exclusivamente. Para tal fin, la manipulación de cepas fue realizada bajo los estándares de bioseguridad determinados por el CDC de Atlanta. Los materiales de desecho fueron eliminados previo tratamiento con solución de hipoclorito a 20.000 ppm o inactivadas con soluciones de esterilización en frío como Garox-30 o amonio

cuaternario de quinta generación, en concordancia con las normativas vigentes (Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud).

8) Análisis estadísticos

Considerando como factores fijos la cepa, el antibiótico y el medio, y como variable respuesta el halo de inhibición en mm, se procedió a realizar dos diferentes análisis de varianza (ANOVA). En el primero, se consideró un diseño con dos factores de clasificación, diseño en bloques completamente al azar y combinación de cepa con antibiótico; y en el segundo se consideró un diseño con tres factores de clasificación sin interacción (antibiótico, cepa y medio). Finalmente, se realizaron pruebas de comparación múltiple a través de la distancia mínima significativa (DMS) con el fin de establecer los niveles de los factores considerados con diferencias significativas. En todos los casos se consideró un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

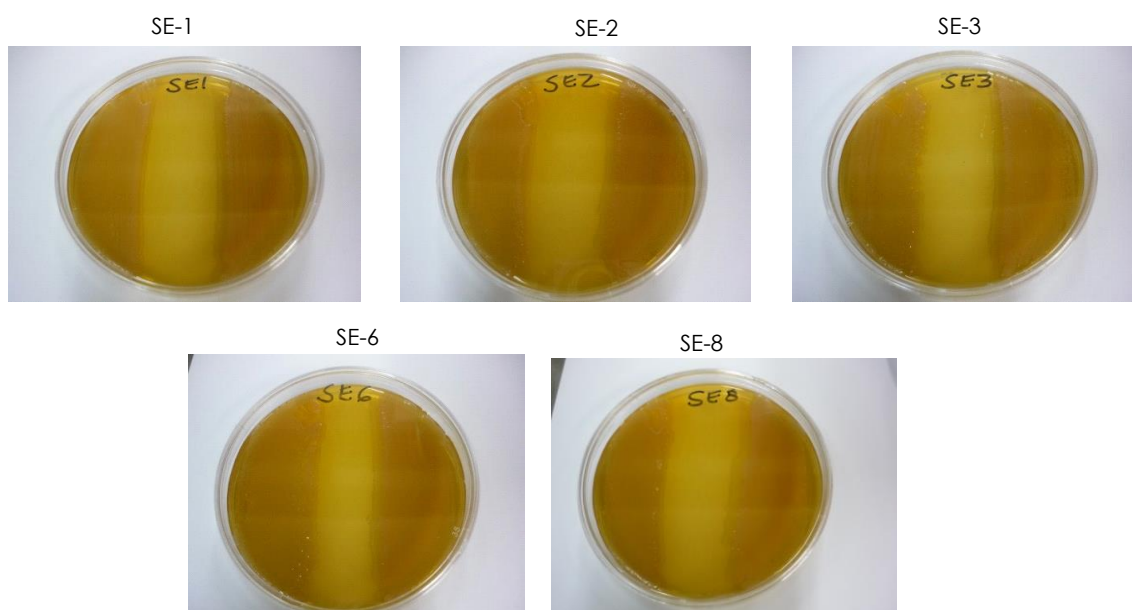
1) Cultivos de *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis.

El cepario del presente trabajo fue obtenido a partir de muestras de superficie, utilizando hisopos de algodón estériles impregnados con solución salina. (Véase figura 7). Los cultivos presentaron crecimiento uniforme y característico tanto en agar BHI como en agar Simons Citrato y SS. Las Colonias aisladas de 2-3 mm de diámetro fueron analizadas por microscopia de luz utilizando tinción de Gram (Véase Figura 8). Los cultivos mostraron morfología celular uniforme y tinción característica para el género *Salmonella*, lo cual fue indicativo de la pureza de los cultivos.

Las cepas se representan en adelante con la sigla SE correspondiente a *Salmonella* entérica serotipo Enteritidis y el numero que la acompaña hace alusión a las diferentes cepas aisladas.

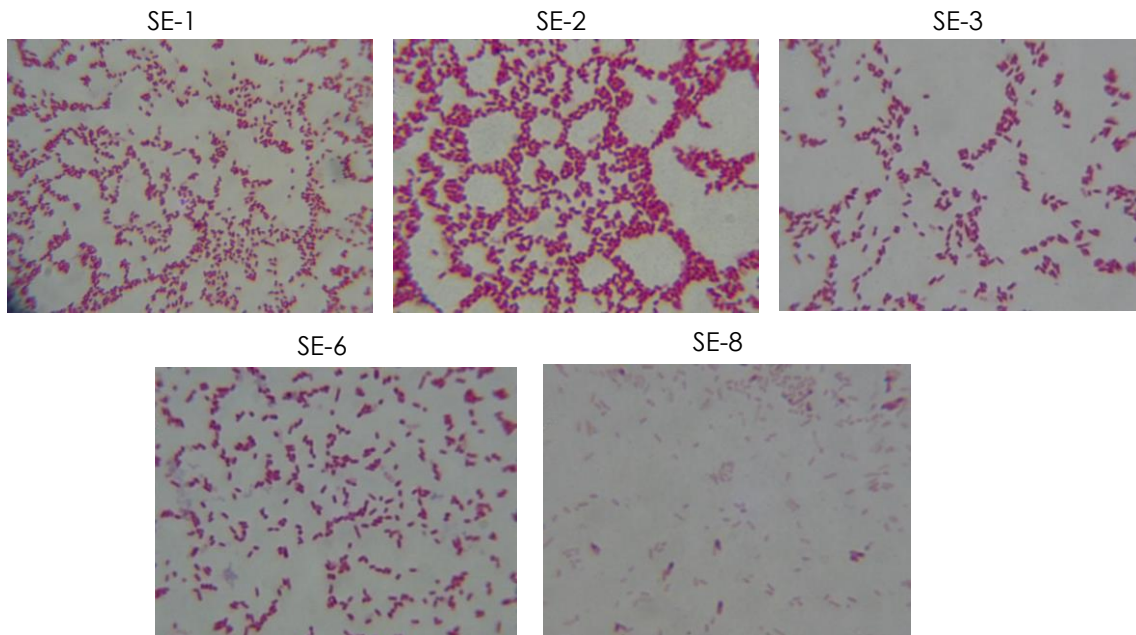
Durante los pasajes de los diferentes aislados, tres de ellos no conservaron las características de crecimiento deseadas, ni presentaron viabilidad adecuada para avanzar en este estudio, motivo por el cual fueron retirados del mismo. Los aislados retirados fueron SE-4, SE-5 y SE-7.

Figura 7. Cepario de *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis*. Medio de cultivo BHI



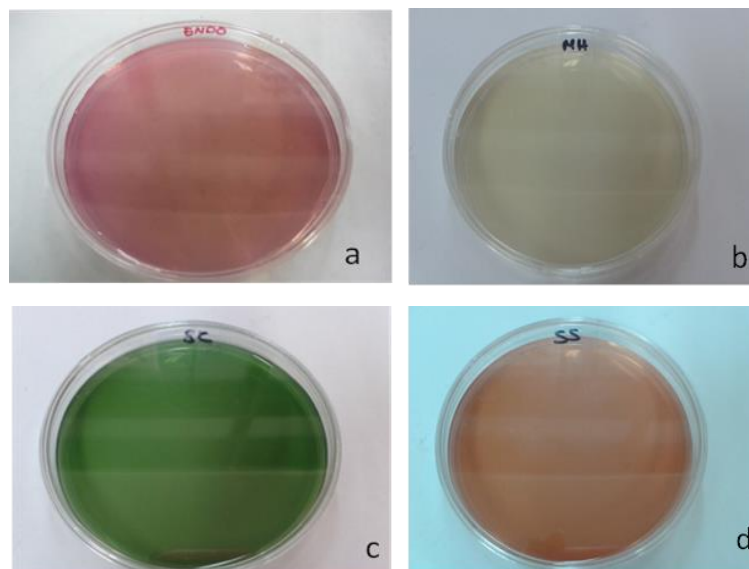
Las cepas mostraron poseer morfología celular uniforme y coloración característica, tal como lo evidencia la siguiente figura:

Figura 8. Coloración y morfología celular de las cinco (5) cepas de *Salmonella enteritica* Serotipo *Enteritidis* empleadas en el presente estudio.



Las colonias correspondientes fueron recultivadas en medios de cultivo selectivos, a saber: Endo Agar, Mueller Hinton Broth (MH), Simons Citrato y Agar *Salmonella Shigella*

Figura 9. Medios de cultivo selectivos empleados en el presente estudio. a) ENDO Agar b) Mueller Hinton Broth; c) Simons Citrato; d) Agar *Salmonella-Shigella*.



Los cultivos de los microorganismos crecidos en medios de cultivos selectivos y diferenciales, presentaron también crecimiento característico, según lo descrito en manuales de laboratorio (Merck/Difco) para el género *Salmonella*, tal como se presenta a continuación (Véase figuras 10-13):

Figura 10. Crecimiento de las cepas de *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis*, en ENDO Agar.

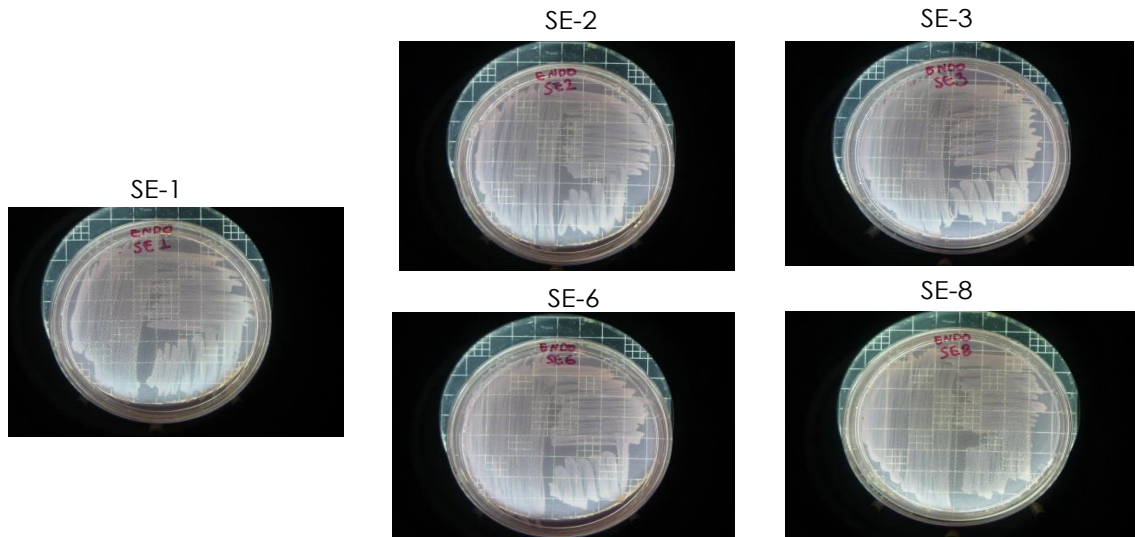


Figura 11. Crecimiento de las cepas de *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis*, en Mueller Hinton Agar.

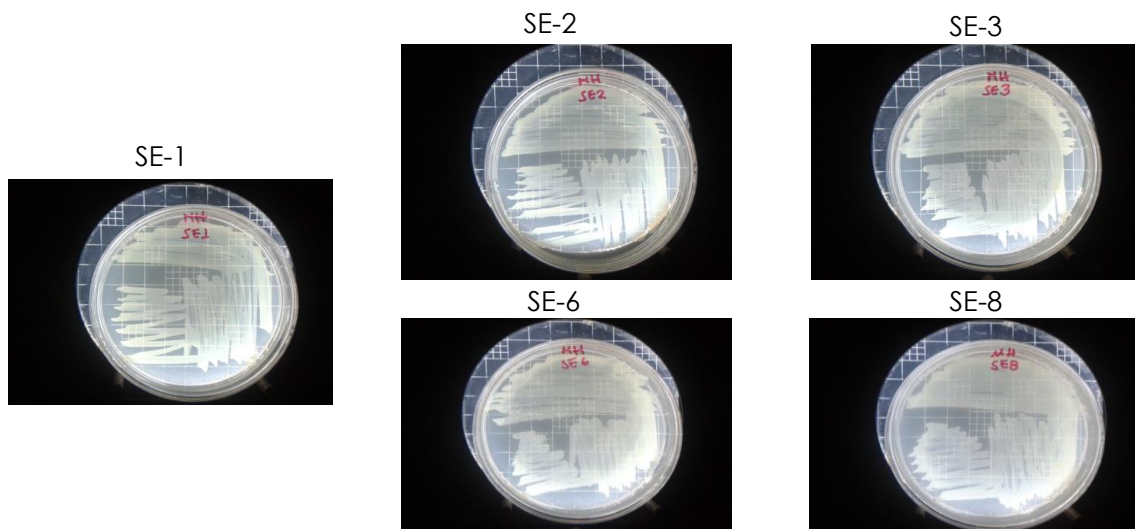


Figura 12. Crecimiento de las cepas de *Salmonella entérica* serotipo *Enteritidis*, en medio de cultivo Simons Citrato.

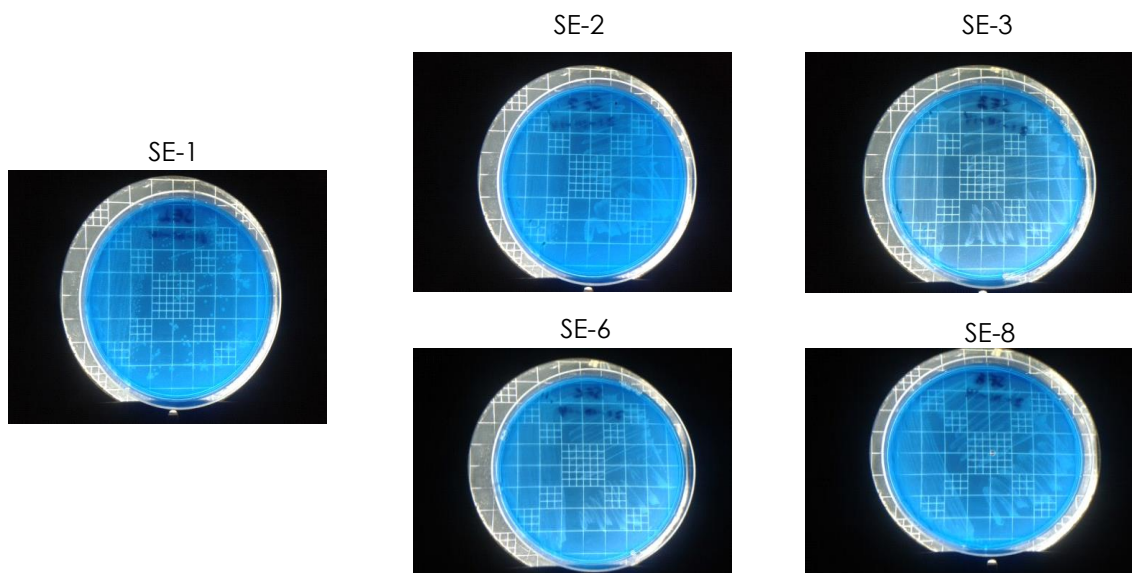
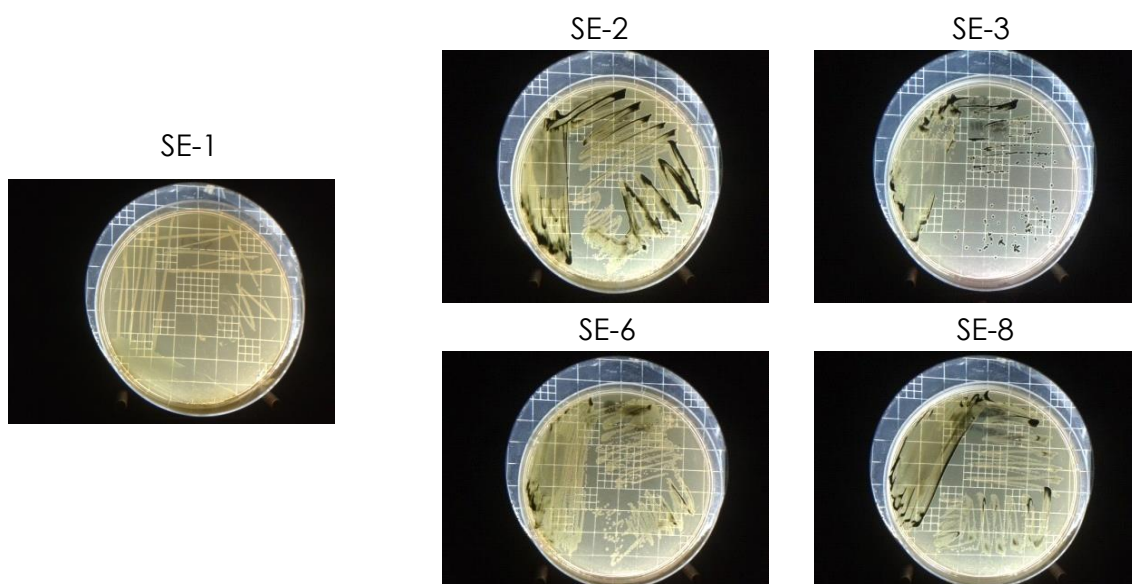


Figura 13. Crecimiento de las cepas de *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis*, en Agar Salmonella Shigella.



2) Perfil de sensibilidad a antibióticos.

Como se mencionó, debido a que durante los pasajes de los diferentes aislados de *Salmonella enterica* (SE), tres de ellos no presentaron viabilidad adecuada para avanzar en este estudio; los resultados de sensibilidad a los antibióticos y efecto de factores quimiotácticos serán reportados de aquí en adelante solo para cinco de los aislados de SE.

Tras 24 horas de incubación se observó una zona circular clara indicativa del efecto antibiótico en la reducción del crecimiento de los microorganismos. La Figura 14 muestra el perfil de sensibilidad a los antibióticos de las diferentes cepas crecidas en agar BHI e inoculadas en placas de agar MH tal y como fue descrito en el numeral tres del capítulo de métodos. Los halos de inhibición para cada uno de los antibióticos seleccionados tomados con la ayuda de una regla con escala milimétrica se encuentran resumidos en la Tabla 2 y Figura 15. Los resultados tabulados son el promedio de tres replicas efectuadas para cada una de las cepas en estudio.

Figura 14. Perfil de sensibilidad Original a antibióticos de las diferentes cepas de *Salmonella* analizadas en el presente estudio.

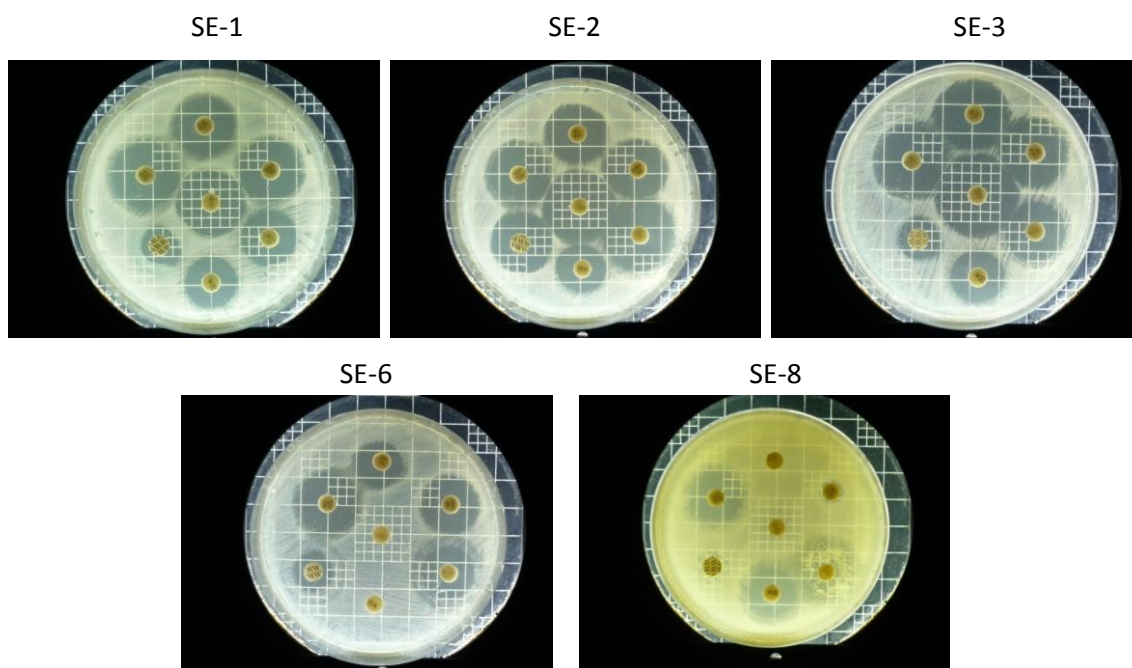
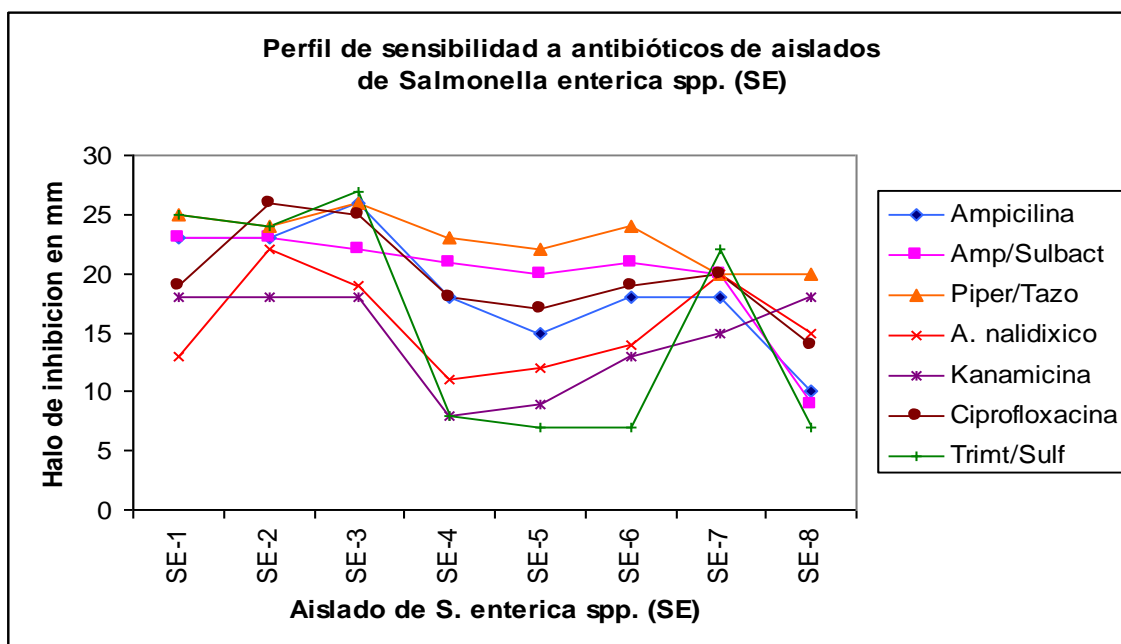


Tabla 2. Perfil de Sensibilidad a Antibióticos de aislados de SE.

CEPA	SE1	SE2	SE3	SE6	SE8
ANTIBIOTICO	Diámetro de Halo de inhibición de crecimiento en (mm)				
Ampicilina 10µg	23	23	26	18	10
Ampicilina-sulbactam 20 µg	23	23	22	21	9
Ciprofloxacina 5µg	19	26	25	19	13
Kanamicina 30µg	18	18	18	13	18
Acido Nalidíxico 30µg	13	22	19	14	15
Piperacilina 100µg +Tazobactam 10µg	25	24	26	24	20
Sulfamethoxazole 23.75 µg + Trimetropin 1.25 µg	23	27	29	10	9

El mayor grado de resistencia se observó en los aislados SE-6 y SE-8, quienes mostraron resistencia a Kanamicina y Trimetroprin/Sulfa en el caso de SE-6 y a Ampicilina, Ampicilina/sulbactam y Trimetropin/Sulfa para SE-8; los aislados SE-1, SE-3, SE-6 y SE-8, presentaron resistencia intermedia al Acido Nalidíxico. De las ocho cepas, SE-2 mostró mayor sensibilidad a los antibióticos seguida de SE-3. Los aislados ordenados de mayor a menor en orden global de resistencia fueron: SE-8 > SE-6 > SE-1 > SE-3 > SE-2. (Tabla 2 y Figuras 14 y 15).

Figura 15. Perfil de sensibilidad a antibióticos de aislados de *Salmonella* entérica spp.



Por otra parte, el efecto de la exposición de los cinco aislados de SE a diferentes factores físico-químicos o quimiotácticos, mostró que la sensibilidad a los antibióticos utilizados se ve afectada en algunos casos de forma positiva (efecto sinérgico) cuando son sometidos a crecimiento en los medios SS y Mossel o negativa (efecto antagónico) para el caso de los medios SC y ENDO. (Véase Tabla 3 y Figuras 16 a 20).

Tabla 3. Efecto de Factores Quimiotácticos sobre el Perfil de Sensibilidad a Antibióticos

Cepa	Halo de inhibición en mm											
	Ampicilina 10 µg											
	CMH	AMH	SC	SS	ENDO	Mos	Ruf	Quer	F1	F2	F3	F4
SE-1	23	25	10	19	13	22	10	15	14	15	-	-
SE-2	23	23	14	18	20	20	15	10	15	15	14	15
SE-3	22	26	12	19	11	20	14	14	14	14	-	-
SE-6	20	18	13	14	13	-	-	-	-	-	-	-
SE-8	11	12	12	19	20	20	18	17	17	18	18	18
Cepa	Halo de inhibición en mm											
	Ampicilina/Sulbactam 20 µg											
	CMH	AMH	SC	SS	ENDO	Mos	Ruf	Quer	F1	F2	F3	F4
SE-1	23	20	16	21	17	23	12	17	15	15	17	17
SE-2	17	22	14	20	20	23	18	13	16	15	13	14
SE-3	25	22	17	20	16	16	16	16	15	15	16	17
SE-6	22	21	12	17	17	19	14	15	13	11	12	12
SE-8	8	10	23	20	22	23	20	19	20	19	17	18
Cepa	Halo de inhibición en mm											
	Piperacilina/tazobactam 100 µg/10 µg											
	CMH	AMH	SC	SS	ENDO	Mos	Ruf	Quer	F1	F2	F3	F4
SE-1	25	25	22	25	17	27	15	25	20	18	20	20
SE-2	27	26	23	30	20	28	22	15	20	22	23	22
SE-3	28	26	23	25	18	27	20	21	18	19	20	21
SE-6	25	24	20	25	20	30	20	21	16	17	20	-
SE-8	22	20	25	22	25	30	22	23	24	25	23	25
Cepa	Halo de inhibición en mm											
	Acido Nalidíxico 30 µg											
	CMH	AMH	SC	SS	ENDO	Mos	Ruf	Quer	F1	F2	F3	F4
SE-1	17	15	20	19	19	23	20	20	-	-	-	-
SE-2	17	22	12	10	13	12	12	10	-	-	-	-
SE-3	18	19	12	10	11	13	13	-	-	-	-	-
SE-6	19	17	16	19	18	22	17	-	-	-	-	-
SE-8	15	15	22	20	23	25	23	-	-	-	-	-
Cepa	Halo de inhibición en mm											
	Kanamicina 30 µg											
	CMH	AMH	SC	SS	ENDO	Mos	Ruf	Quer	F1	F2	F3	F4
SE-1	18	20	18	23	21	24	15	17	18	17	18	20
SE-2	16	18	18	22	-	25	18	17	17	18	20	20

Tabla 3. (Continuación)

SE-3	19	18	19	20	-	24	18	17	17	18	20	20
SE-6	11	13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SE-8	5	16	19	23	22	25	22	21	22	22	20	23
Cepa	Halo de inhibición en mm											
	Ciprofloxacina 5 µg											
	CMH	AMH	SC	SS	ENDO	Mos	Ruf	Quer	F1	F2	F3	F4
SE-1	19	30	32	30	28	30	16	25	16	27	30	32
SE-2	25	26	22	24	21	24	20	17	24	20	22	22
SE-3	25	25	23	22	20	25	25	20	23	23	23	24
SE-6	30	29	30	33	30	30	30	30	30	31	32	33
SE-8	10	10	14	12	15	20	16	17	17	16	17	17
Cepa	Halo de inhibición en mm											
	Trímetropin/Sulfametoxazol 1.25 µg/23.75 µg											
	CMH	AMH	SC	SS	ENDO	Mos	Ruf	Quer	F1	F2	F3	F4
SE-1	22	25	23	25	20	30	14	20	19	18	20	21
SE-2	24	24	17	20	20	16	16	11	15	16	18	20
SE-3	29	27	23	23	21	28	20	22	20	20	20	21
SE-6	10	11	10	8	7	7	9	12	10	12	12	10
SE-8	8	8	16	15	16	20	14	15	15	18	20	22

El efecto más sobresaliente del efecto sinérgico de los factores quimiotácticos sobre el efecto antibiótico se pudo observar sobre el aislado SE-8, el cual pasó de ser resistente a ser sensible a la mayoría de los antibióticos ensayados (Tabla 3 y Figura 20). Un patrón de respuesta similar al generado por SE-8 se observa para el aislado SE-1, tan solo para algunos de los factores quimiotácticos ensayados (Tabla 3 y Figura 16). Para los aislados SE-2, SE-3 y SE-6 no se observaron patrones de comportamiento en variación del perfil de sensibilidad a los observados para SE-1 y SE-8, presentando cambios mínimos en el mismo.

Los medios de cultivo que afectaron con mayor aidez el perfil de sensibilidad a los antibióticos en los diferentes aislados fueron el agar SS y el agar Mossel. El efecto de estos dos medios de cultivo se observó preferentemente sobre los aislados SE-1 y SE-8, quienes incrementaron la sensibilidad a Ciprofloxacina, Piperacilina/tazobactam, Ampicilina sulbactam, Kanamicina y A. Nalidíxico.

Los compuestos químicos aislados de plantas, conformados preferencialmente por flavonoides mostraron un efecto antagónico sobre los antibióticos, sobre cuatro de los cinco aislados (SE-1, SE-2, SE-3 y SE-6), a excepción de un incremento de la actividad de todos los antibióticos sobre el aislado SE-8. (Tabla 3 y Figura 20).

Figura 16. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-1.

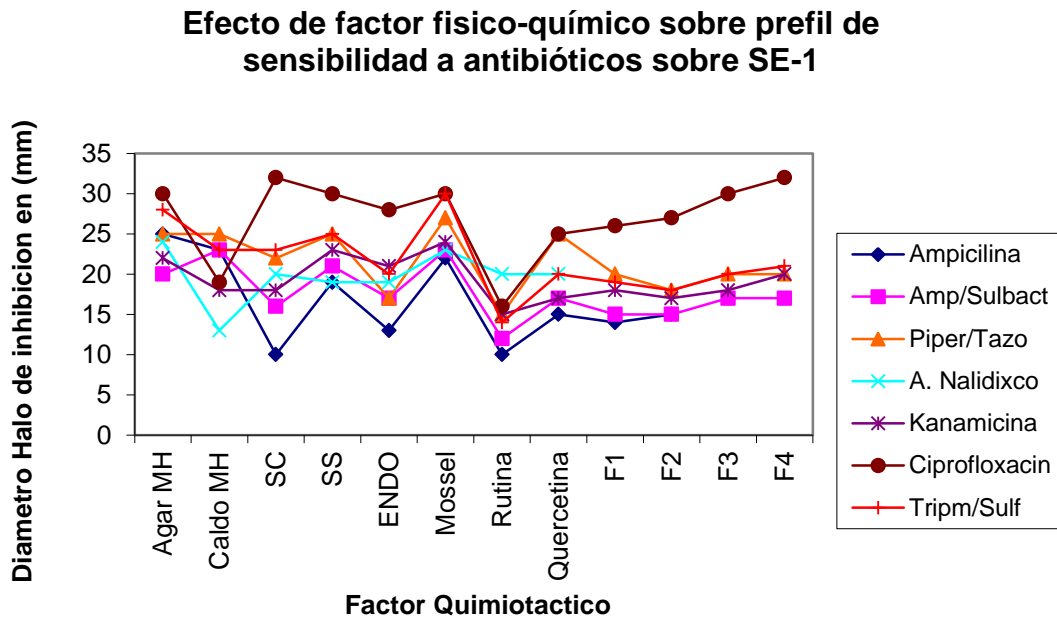


Figura 17. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-2.

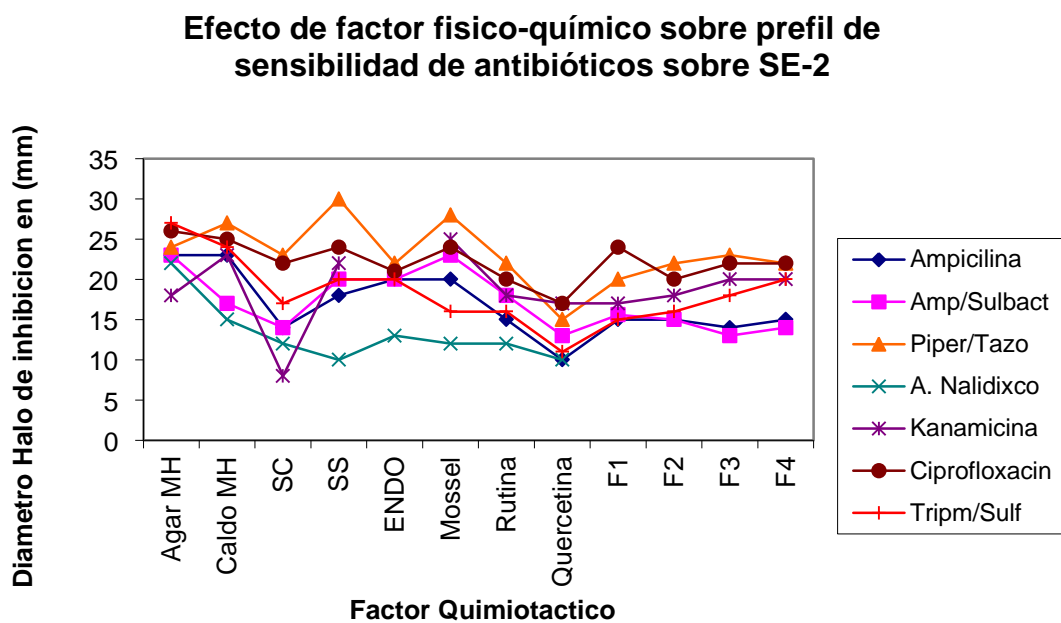


Figura 18. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-3.

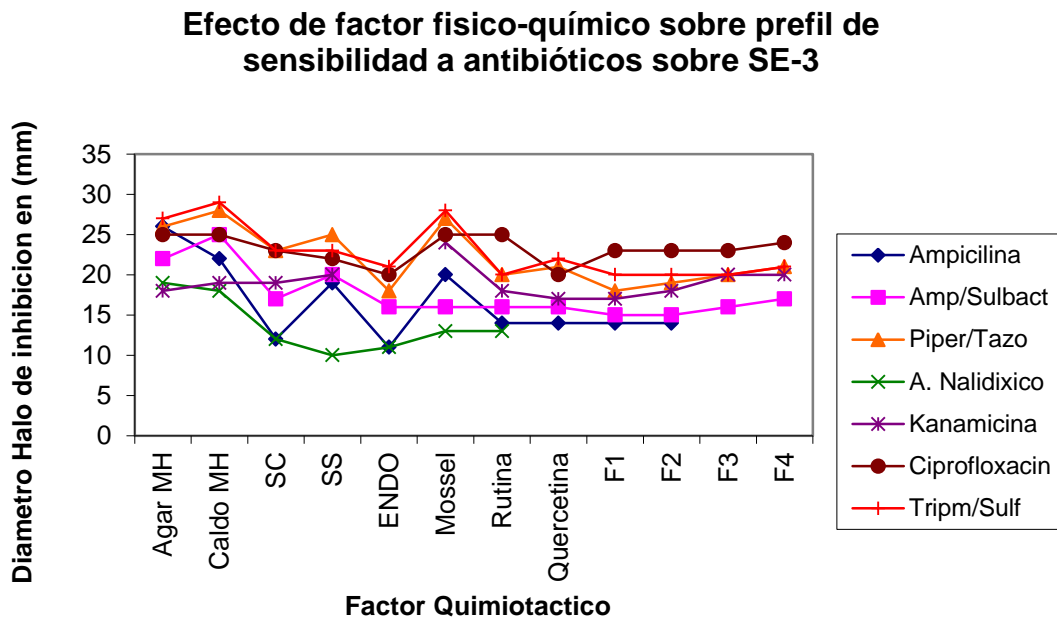


Figura 19. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-6.

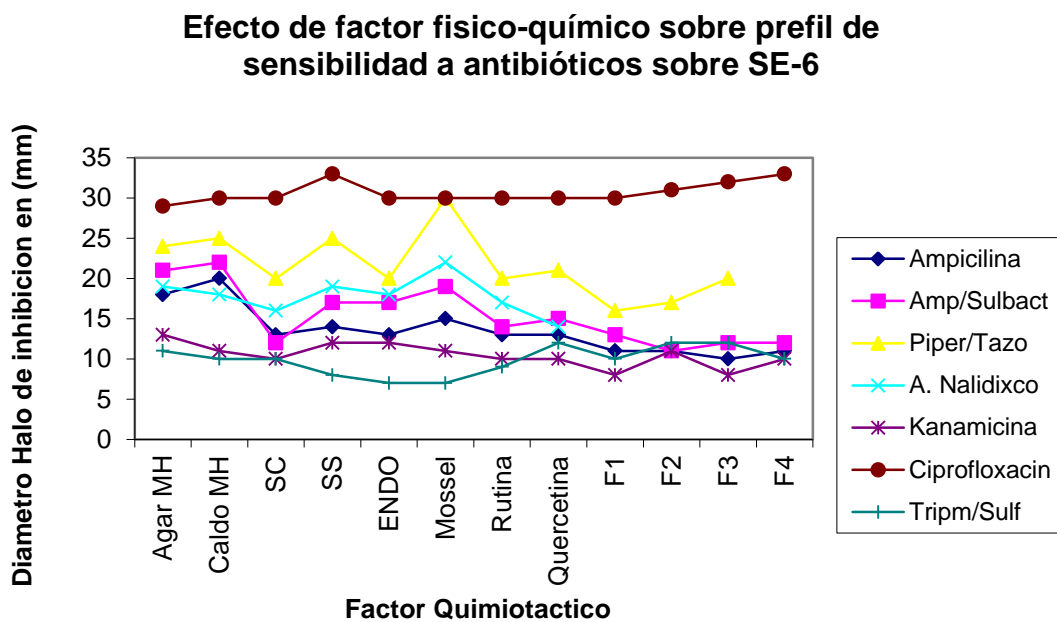
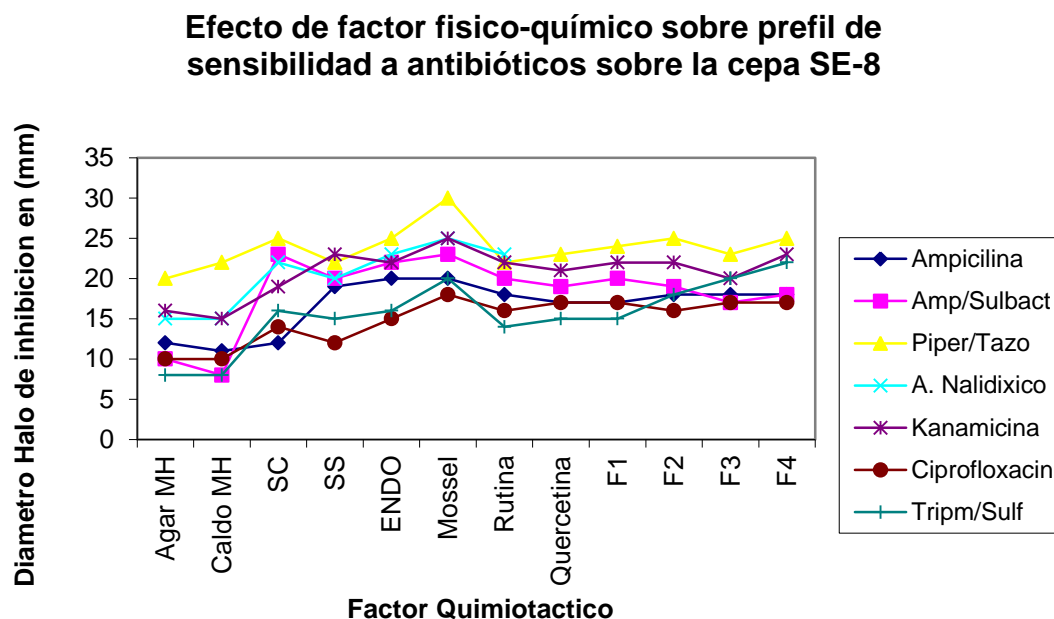


Figura 20. Efecto de los factores físico químicos sobre el perfil de sensibilidad a antibióticos sobre la cepa SE-8.



Con el fin de robustecer la interpretación de los resultados previamente descritos, se llevó a cabo dos diferentes análisis de varianza (ANOVA), en los cuales se consideraron en primer lugar un diseño con dos factores de clasificación, diseño en bloques completamente al azar y combinación de cepa con antibiótico; y en el segundo, un diseño con tres factores de clasificación sin interacción (antibiótico, cepa y medio). En todos los casos se consideró un nivel de significancia del 5%.

A continuación se presentan los resultados del primer diseño descrito:

Tabla 4. Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Antibiótico	170,9714286	6	28,4952381	1,990354232	0,10684805	2,508188823
Cepa	526	4	131,5	9,185098952	0,000119593	2,776289289
Error	343,6	24	14,31666667			
Total	1040,571429	34				

Lo anterior quiere decir que existen diferencias significativas entre las Cepas y los halos de inhibición producidos por los antibióticos, dejando entre ver que se trata de cepas distintas, con las cuales se puede trabajar en el estudio.

Para el caso del segundo diseño se evidenció lo siguiente:

Tabla 5. Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Halo

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor p)
Modelo corregido	3773,760	21	179,703	9,424	,000
Intersección	125235,792	1	125235,792	6567,773	,000
Cepa	232,138	4	58,034	3,044	,017
Medio	889,325	11	80,848	4,240	,000
Antibiótico	2744,868	6	457,478	23,992	,000
Error	6692,948	351	19,068		
Total	148446,000	373			
Total corregida	10466,708	372			

De igual forma, una vez sometidas a diferentes condiciones de estrés bajo los diversos factores quimiotácticos, se confirmó a nivel estadístico, que existen diferencias significativas entre las variables Cepa, medio y antibiótico dado el valor p obtenido. (Véase Tabla 5).

Finalmente, se realizaron pruebas de comparación múltiple a través de la distancia mínima significativa (DMS) con el fin de establecer los niveles de los factores considerados con diferencias significativas, de ello cabe resaltar lo siguiente:

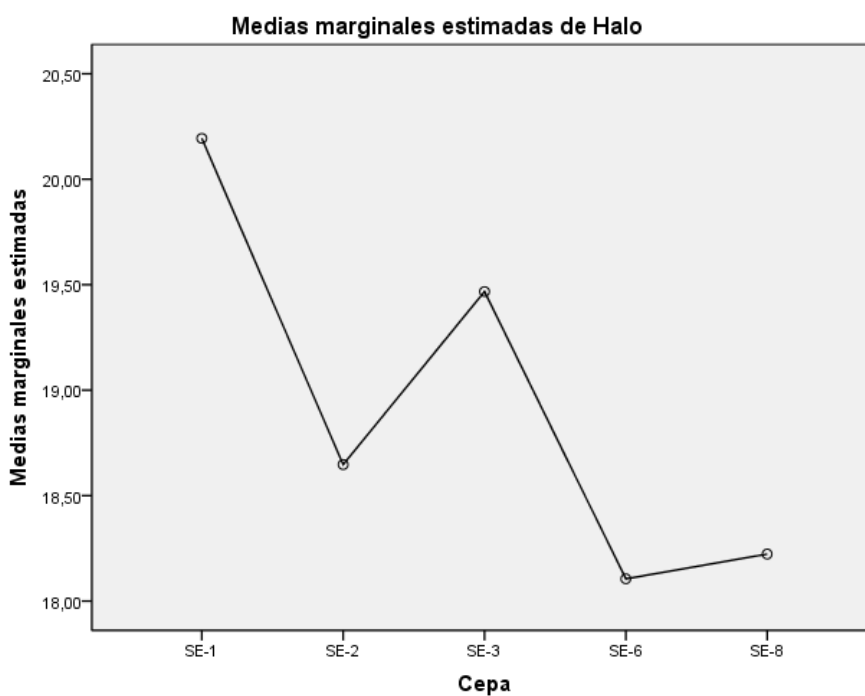
Respecto a la variable Cepa, se presentaron diferencias significativas entre las cepas SE-1, SE-2, SE-6 y SE-8 de manera recíproca (Véase Tabla 6), así como un halo de inhibición mayor para la SE-1 y menor para la SE-6 y SE-8 posterior a los tratamientos. (Véase figura 21).

Tabla 6. Comparaciones múltiples – Variable Cepa

Halo/ DMS

(I)Cepa	(J)Cepa	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
SE-1	SE-2	1,6001	,69702	,022	,2293	2,9710
	SE-3	,6603	,70382	,349	-,7240	2,0445
	SE-6	1,7381	,74636	,020	,2702	3,2060
	SE-8	1,9799	,69702	,005	,6090	3,3507
SE-2	SE-1	-1,6001	,69702	,022	-2,9710	-,2293
	SE-3	-,9399	,70162	,181	-2,3198	,4400
	SE-6	,1380	,74429	,853	-1,3258	1,6018
	SE-8	,3797	,69479	,585	-,9867	1,7462
SE-3	SE-1	-,6603	,70382	,349	-2,0445	,7240
	SE-2	,9399	,70162	,181	-,4400	2,3198
	SE-6	1,0779	,75066	,152	-,3985	2,5542
	SE-8	1,3196	,70162	,061	-,0603	2,6995
SE-6	SE-1	-1,7381	,74636	,020	-3,2060	-,2702
	SE-2	-,1380	,74429	,853	-1,6018	1,3258
	SE-3	-1,0779	,75066	,152	-2,5542	,3985
	SE-8	,2418	,74429	,746	-1,2221	1,7056
SE-8	SE-1	-1,9799	,69702	,005	-3,3507	-,6090
	SE-2	-,3797	,69479	,585	-1,7462	,9867
	SE-3	-1,3196	,70162	,061	-2,6995	,0603
	SE-6	-,2418	,74429	,746	-1,7056	1,2221

Figura 21. Comparaciones múltiples – Variable Cepa



Respecto a la variable Medio o Factor Quimiotáctico, se presentaron diferencias significativas entre el Medio Mossel y todos los demás medios y factores considerados en el estudio. De igual forma, entre el Agar Mueller Hinton y Rutina, Quercetina, SS y F1; y entre SS y F1, Rutina y Quercetina. (Véase Tabla 7 y Figura 22)

Tabla 7. Comparaciones múltiples – Variable Medio o Factor Quimiotáctico

Halo /DMS

(I)Medio	(J)Medio	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
AMH	CMH	,8571	1,04385	,412	-1,1958	2,9101
	ENDO	1,6661	1,06803	,120	-,4345	3,7666
	F1	2,3714	1,10717	,033	,1939	4,5489
	F2	1,8714	1,10717	,092	-,3061	4,0489
	F3	,8055	1,13058	,477	-1,4181	3,0290
	F4	,0686	1,14348	,952	-2,1804	2,3175
	Mos	-2,5290	1,05954	,018	-4,6129	-,4452
	Quer	2,4952	1,08647	,022	,3584	4,6320
	Rut	2,8346	1,05954	,008	,7508	4,9185
	SC	1,9345	1,05149	,067	-,1336	4,0025
SS	-,1244	1,05149	,906	-2,1924	1,9436	
CMH	AMH	-,8571	1,04385	,412	-2,9101	1,1958
	ENDO	,8089	1,06803	,449	-1,2916	2,9095
	F1	1,5143	1,10717	,172	-,6632	3,6918
	F2	1,0143	1,10717	,360	-1,1632	3,1918
	F3	-,0516	1,13058	,964	-2,2752	2,1719
	F4	-,7886	1,14348	,491	-3,0375	1,4604
	Mos	-3,3861	1,05954	,002	-5,4700	-1,3023
	Quer	1,6381	1,08647	,133	-,4987	3,7749
	Rut	1,9775	1,05954	,063	-,1064	4,0613
	SC	1,0773	1,05149	,306	-,9907	3,1453
SS	-,9815	1,05149	,351	-3,0495	1,0865	
ENDO	AMH	-1,6661	1,06803	,120	-3,7666	,4345
	CMH	-,8089	1,06803	,449	-2,9095	1,2916
	F1	,7054	1,13000	,533	-1,5171	2,9278
	F2	,2054	1,13000	,856	-2,0171	2,4278
	F3	-,8606	1,15294	,456	-3,1281	1,4070
	F4	-1,5975	1,16559	,171	-3,8899	,6949
	Mos	-4,1951	1,08338	,000	-6,3258	-2,0643
	Quer	,8292	1,10973	,455	-1,3534	3,0117
	Rut	1,1686	1,08338	,281	-,9622	3,2993
	SC	,2684	1,07551	,803	-1,8469	2,3836
SS	-1,7904	1,07551	,097	-3,9057	,3248	
Mos	AMH	2,5290	1,05954	,018	,4452	4,6129
	CMH	3,3861	1,05954	,002	1,3023	5,4700
	ENDO	4,1951	1,08338	,000	2,0643	6,3258
	F1	4,9004	1,12198	,000	2,6938	7,1071
	F2	4,4004	1,12198	,000	2,1938	6,6071
	F3	3,3345	1,14508	,004	1,0824	5,5866
	F4	2,5976	1,15782	,025	,3204	4,8747
	Quer	5,0242	1,10156	,000	2,8578	7,1907
	Rut	5,3636	1,07501	,000	3,2494	7,4779
	SC	4,4635	1,06708	,000	2,3648	6,5621
SS	2,4046	1,06708	,025	,3060	4,5033	
SC	AMH	-1,9345	1,05149	,067	-4,0025	,1336
	CMH	-1,0773	1,05149	,306	-3,1453	,9907
	ENDO	-,2684	1,07551	,803	-2,3836	1,8469
	F1	,4370	1,11438	,695	-1,7547	2,6287

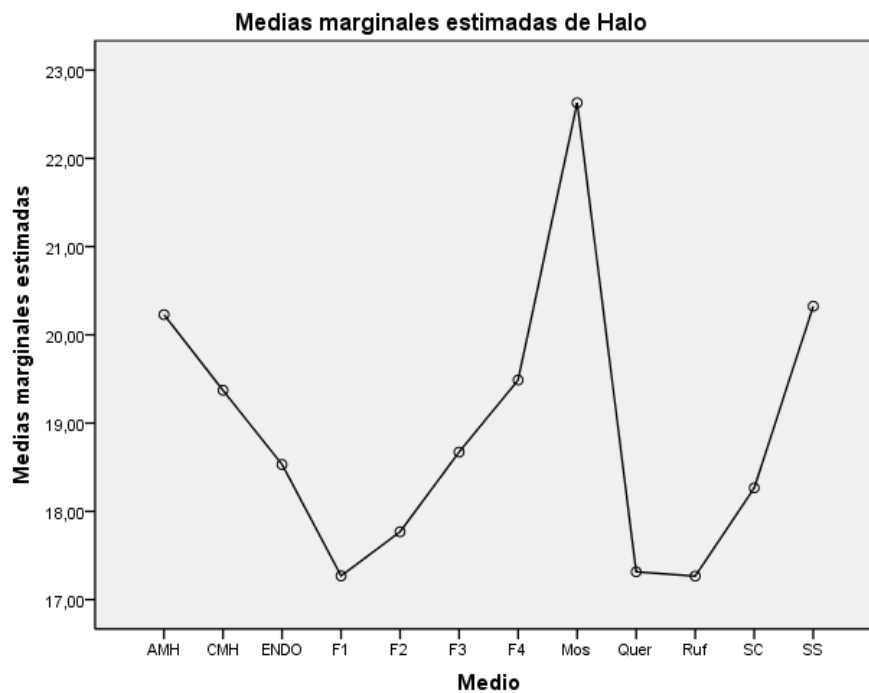
Halo /DMS

(I)Medio	(J)Medio	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	F2	-,0630	1,11438	,955	-2,2547	2,1287
	F3	-1,1290	1,13764	,322	-3,3664	1,1085
	F4	-1,8659	1,15046	,106	-4,1285	,3968
	Mos	-4,4635	1,06708	,000	-6,5621	-2,3648
	Quer	,5608	1,09382	,608	-1,5905	2,7120
	Rut	,9002	1,06708	,399	-1,1985	2,9988
	SS	-2,0588	1,05908	,053	-4,1418	,0241
	SS	AMH	,1244	1,05149	,906	-1,9436
CMH		,9815	1,05149	,351	-1,0865	3,0495
ENDO		1,7904	1,07551	,097	-,3248	3,9057
F1		2,4958	1,11438	,026	,3041	4,6875
F2		1,9958	1,11438	,074	-,1959	4,1875
F3		,9299	1,13764	,414	-1,3076	3,1673
F4		,1929	1,15046	,867	-2,0697	2,4556
Mos		-2,4046	1,06708	,025	-4,5033	-,3060
Quer		2,6196	1,09382	,017	,4683	4,7709
Rut		2,9590	1,06708	,006	,8603	5,0577
SC		2,0588	1,05908	,053	-,0241	4,1418
Quer		AMH	-2,4952	1,08647	,022	-4,6320
	CMH	-1,6381	1,08647	,133	-3,7749	,4987
	ENDO	-,8292	1,10973	,455	-3,0117	1,3534
	F1	-,1238	1,14744	,914	-2,3805	2,1329
	F2	-,6238	1,14744	,587	-2,8805	1,6329
	F3	-1,6897	1,17004	,150	-3,9909	,6114
	F4	-2,4267	1,18251	,041	-4,7524	-,1010
	Mos	-5,0242	1,10156	,000	-7,1907	-2,8578
	Rut	,3394	1,10156	,758	-1,8271	2,5059
	SC	-,5608	1,09382	,608	-2,7120	1,5905
	SS	-2,6196	1,09382	,017	-4,7709	-,4683
	Rut	AMH	-2,8346	1,05954	,008	-4,9185
CMH		-1,9775	1,05954	,063	-4,0613	,1064
ENDO		-1,1686	1,08338	,281	-3,2993	,9622
F1		-,4632	1,12198	,680	-2,6698	1,7434
F2		-,9632	1,12198	,391	-3,1698	1,2434
F3		-2,0291	1,14508	,077	-4,2812	,2230
F4		-2,7661	1,15782	,017	-5,0432	-,4889
Mos		-5,3636	1,07501	,000	-7,4779	-3,2494
Quer		-,3394	1,10156	,758	-2,5059	1,8271
SC		-,9002	1,06708	,399	-2,9988	1,1985
SS		-2,9590	1,06708	,006	-5,0577	-,8603
F1		AMH	-2,3714	1,10717	,033	-4,5489
	CMH	-1,5143	1,10717	,172	-3,6918	,6632
	ENDO	-,7054	1,13000	,533	-2,9278	1,5171
	F2	-,5000	1,16705	,669	-2,7953	1,7953
	F3	-1,5659	1,18929	,189	-3,9050	,7731
	F4	-2,3029	1,20156	,056	-4,6660	,0603
	Mos	-4,9004	1,12198	,000	-7,1071	-2,6938
	Quer	,1238	1,14744	,914	-2,1329	2,3805
	Rut	,4632	1,12198	,680	-1,7434	2,6698
	SC	-,4370	1,11438	,695	-2,6287	1,7547
	SS	-2,4958	1,11438	,026	-4,6875	-,3041
	F2	AMH	-1,8714	1,10717	,092	-4,0489
CMH		-1,0143	1,10717	,360	-3,1918	1,1632
ENDO		-,2054	1,13000	,856	-2,4278	2,0171
F1		,5000	1,16705	,669	-1,7953	2,7953
F3		-1,0659	1,18929	,371	-3,4050	1,2731
F4		-1,8029	1,20156	,134	-4,1660	,5603

Halo /DMS

(I)Medio	(J)Medio	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	Mos	-4,4004	1,12198	,000	-6,6071	-2,1938
	Quer	,6238	1,14744	,587	-1,6329	2,8805
	Rut	,9632	1,12198	,391	-1,2434	3,1698
	SC	,0630	1,11438	,955	-2,1287	2,2547
	SS	-1,9958	1,11438	,074	-4,1875	,1959
F3	AMH	-,8055	1,13058	,477	-3,0290	1,4181
	CMH	,0516	1,13058	,964	-2,1719	2,2752
	ENDO	,8606	1,15294	,456	-1,4070	3,1281
	F1	1,5659	1,18929	,189	-,7731	3,9050
	F2	1,0659	1,18929	,371	-1,2731	3,4050
	F4	-,7369	1,22316	,547	-3,1426	1,6687
	Mos	-3,3345	1,14508	,004	-5,5866	-1,0824
	Quer	1,6897	1,17004	,150	-,6114	3,9909
	Rut	2,0291	1,14508	,077	-,2230	4,2812
	SC	1,1290	1,13764	,322	-1,1085	3,3664
	SS	-,9299	1,13764	,414	-3,1673	1,3076
F4	AMH	-,0686	1,14348	,952	-2,3175	2,1804
	CMH	,7886	1,14348	,491	-1,4604	3,0375
	ENDO	1,5975	1,16559	,171	-,6949	3,8899
	F1	2,3029	1,20156	,056	-,0603	4,6660
	F2	1,8029	1,20156	,134	-,5603	4,1660
	F3	,7369	1,22316	,547	-1,6687	3,1426
	Mos	-2,5976	1,15782	,025	-4,8747	-,3204
	Quer	2,4267	1,18251	,041	,1010	4,7524
	Rut	2,7661	1,15782	,017	,4889	5,0432
	SC	1,8659	1,15046	,106	-,3968	4,1285
	SS	-,1929	1,15046	,867	-2,4556	2,0697

Figura 22. Comparaciones múltiples – Variable Medio o Factor Quimiotáctico



Finalmente, con relación a la variable Antibiótico, se presentaron diferencias significativas entre la Ciprofloxacina y todos los demás antibióticos considerados en el estudio a excepción de Piperacilina/Tazobactam; de igual forma, entre la Kanamicina y los antibióticos, excepto para el caso del Trimetropin/Sulfa; y entre el Ácido Nalidíxico, Ampicilina y Ampicilina/Sulbactam con relación a la Piperacilina/Tazobactam (Véase Tabla 8). De éstos quien provocó un mayor halo de inhibición fueron Ciprofloxacina y Piperacilina/Sulbactam, seguido de Piperacilina/Tazobactam y Kanamicina (Véase figura 23).

Tabla 8. Comparaciones múltiples – Variable Antibiótico

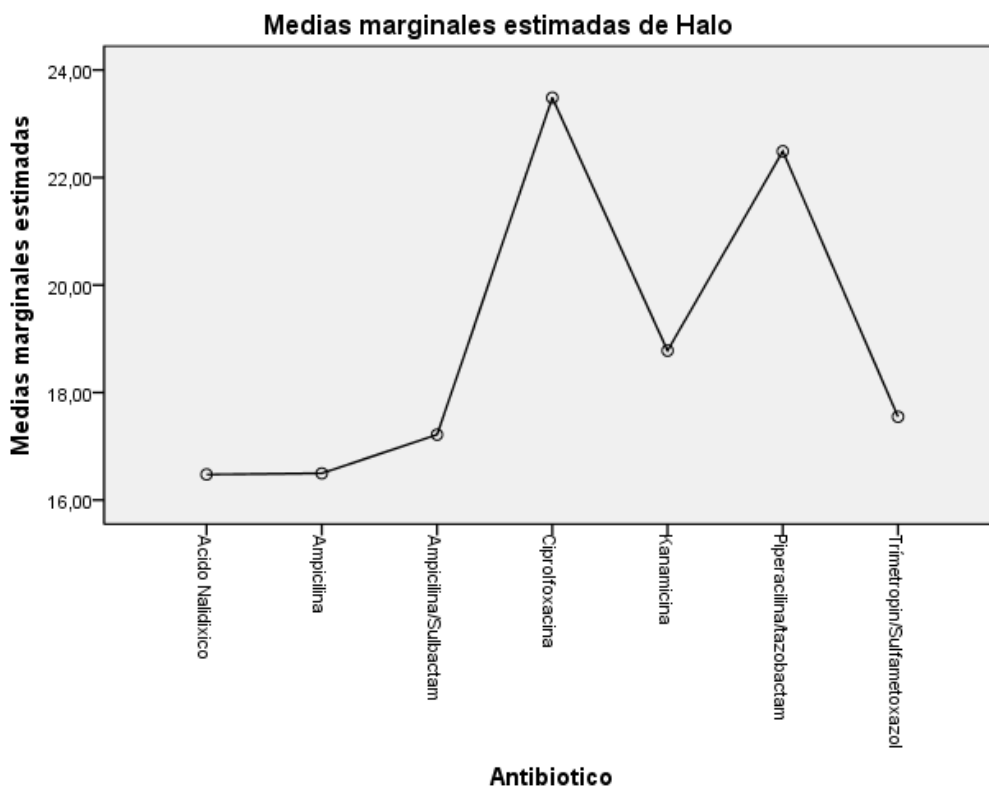
Halo/ DMS

(I)Antibiótico	(J)Antibiótico	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Acido Nalidixico	Ampicilina	,4015	,95105	,673	-1,4689	2,2720
	Ampicilina/Sulbactam	-,2437	,91278	,790	-2,0389	1,5515
	Ciprofloxacina	-6,5104	,91278	,000	-8,3056	-4,7152
	Kanamicina	-2,0270	,95531	,035	-3,9059	-,1482
	Piperacilina/tazobactam	-5,5186	,91572	,000	-7,3195	-3,7176
	Trímetropin/Sulfametoxazol	-,5770	,91278	,528	-2,3722	1,2182
Ampicilina	Acido Nalidixico	-,4015	,95105	,673	-2,2720	1,4689
	Ampicilina/Sulbactam	-,6452	,84080	,443	-2,2989	1,0084
	Ciprofloxacina	-6,9119	,84080	,000	-8,5656	-5,2583
	Kanamicina	-2,4286	,88679	,006	-4,1727	-,6845
	Piperacilina/tazobactam	-5,9201	,84400	,000	-7,5800	-4,2602
	Trímetropin/Sulfametoxazol	-,9786	,84080	,245	-2,6322	,6751
Ampicilina/Sulbactam	Acido Nalidixico	,2437	,91278	,790	-1,5515	2,0389
	Ampicilina	,6452	,84080	,443	-1,0084	2,2989
	Ciprofloxacina	-6,2667	,79725	,000	-7,8347	-4,6987
	Kanamicina	-1,7833	,84561	,036	-3,4464	-,1202
	Piperacilina/tazobactam	-5,2749	,80062	,000	-6,8495	-3,7002
	Trímetropin/Sulfametoxazol	-,3333	,79725	,676	-1,9013	1,2347
Ciprofloxacina	Acido Nalidixico	6,5104	,91278	,000	4,7152	8,3056
	Ampicilina	6,9119	,84080	,000	5,2583	8,5656
	Ampicilina/Sulbactam	6,2667	,79725	,000	4,6987	7,8347
	Kanamicina	4,4833	,84561	,000	2,8202	6,1464
	Piperacilina/tazobactam	,9918	,80062	,216	-,5828	2,5664
	Trímetropin/Sulfametoxazol	5,9333	,79725	,000	4,3653	7,5013
Kanamicina	Acido Nalidixico	2,0270	,95531	,035	,1482	3,9059
	Ampicilina	2,4286	,88679	,006	,6845	4,1727
	Ampicilina/Sulbactam	1,7833	,84561	,036	,1202	3,4464
	Ciprofloxacina	-4,4833	,84561	,000	-6,1464	-2,8202

Halo/ DMS

(I)Antibiótico	(J)Antibiótico	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	Piperacilina/tazobactam	-3,4915	,84879	,000	-5,1609	-1,8222
	Trímetropin/Sulfametoxazol	1,4500	,84561	,087	-,2131	3,1131
Piperacilina/tazobactam	Acido Nalidixico	5,5186	,91572	,000	3,7176	7,3195
	Ampicilina	5,9201	,84400	,000	4,2602	7,5800
	Ampicilina/Sulbactam	5,2749	,80062	,000	3,7002	6,8495
	Ciprofloxacina	-,9918	,80062	,216	-2,5664	,5828
	Kanamicina	3,4915	,84879	,000	1,8222	5,1609
	Trímetropin/Sulfametoxazol	4,9415	,80062	,000	3,3669	6,5161
Trímetropin/Sulfametoxazol	Acido Nalidixico	,5770	,91278	,528	-1,2182	2,3722
	Ampicilina	,9786	,84080	,245	-,6751	2,6322
	Ampicilina/Sulbactam	,3333	,79725	,676	-1,2347	1,9013
	Ciprofloxacina	-5,9333	,79725	,000	-7,5013	-4,3653
	Kanamicina	-1,4500	,84561	,087	-3,1131	,2131
	Piperacilina/tazobactam	-4,9415	,80062	,000	-6,5161	-3,3669

Figura 23. Comparaciones múltiples – Variable Antibiótico



3. Respuesta de aislados de *Salmonella Entérica spp* a medicamentos no-antibióticos

La toxicidad relativa de medicamentos tipo no-antibiótico sobre los aislados de SE fue ensayada. Este experimento tuvo como objeto determinar si otros factores quimiotácticos (xenobioticos), en este caso medicamentos no pertenecientes a la familia de los antibióticos y que no tienen blanco terapéutico definido sobre este microorganismo ejercen un efecto tipo antibiótico. Los medicamentos seleccionados para este ensayo fueron: Clonazepan, Midazolam, Diclofenaco, Ceterizina, Haloperidol, y Timolol. El resultado de este ensayo se resume en la Figura 24 y Tabla 9.

Figura 24. Perfil de sensibilidad de aislados de *Salmonella* entérica spp a medicamentos no antibióticos.

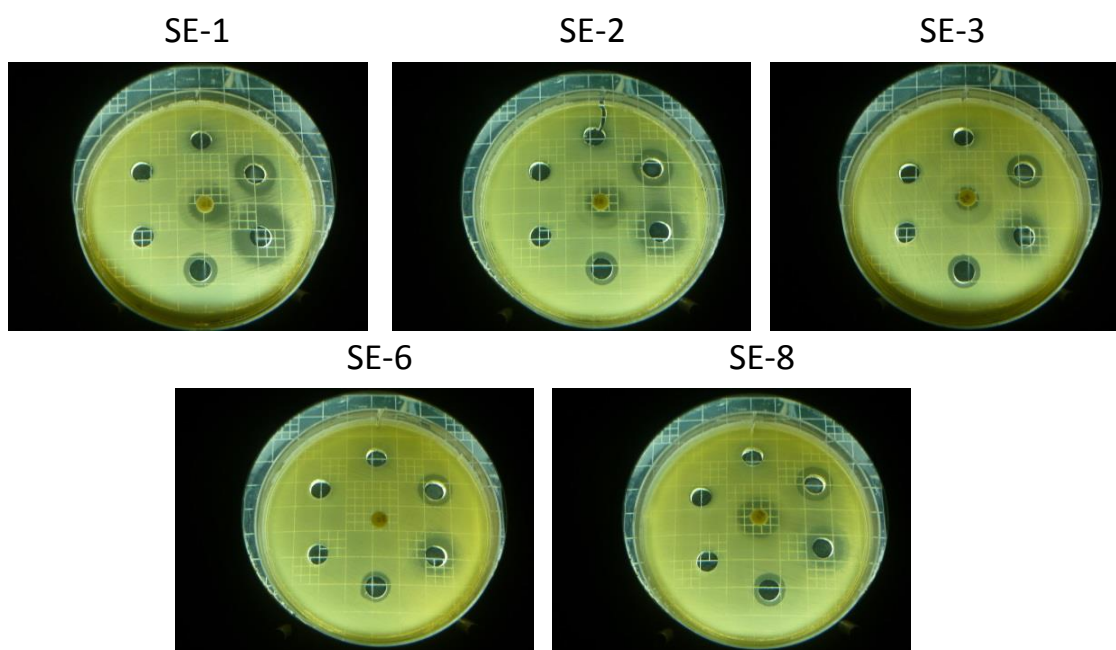


Tabla 9. Efecto antimicrobiano de medicamentos no antibióticos sobre aislados de *Salmonella entérica*.

Medicamento	SE-1	SE-2	SE-3	SE-6	SE-8
	Halo de inhibición en mm				
Clonazepam	12	12	-	-	-
Diclofenaco	15	15	13	13	14
Ceterizina	19	18	14	17	17
Haloperidol	12	12	12	11	12
Midazolam	-	-	-	-	-
Timolol	-	-	-	-	-
Ampicilina	22	21	24	18	16

Como se puede observar, el Diclofenaco (analgésico-antiinflamatorio) y la Ceterizina (antihistamínico), son los medicamentos no antibióticos que inhiben con mayor eficacia el crecimiento de los diferentes aislados de SE. Medicamentos como el Clonazepam y Haloperidol ejercen un efecto inhibitorio menor, presentado sensibilidad al Clonazepam únicamente los aislados SE-1 y SE-2

3) Electroforesis.

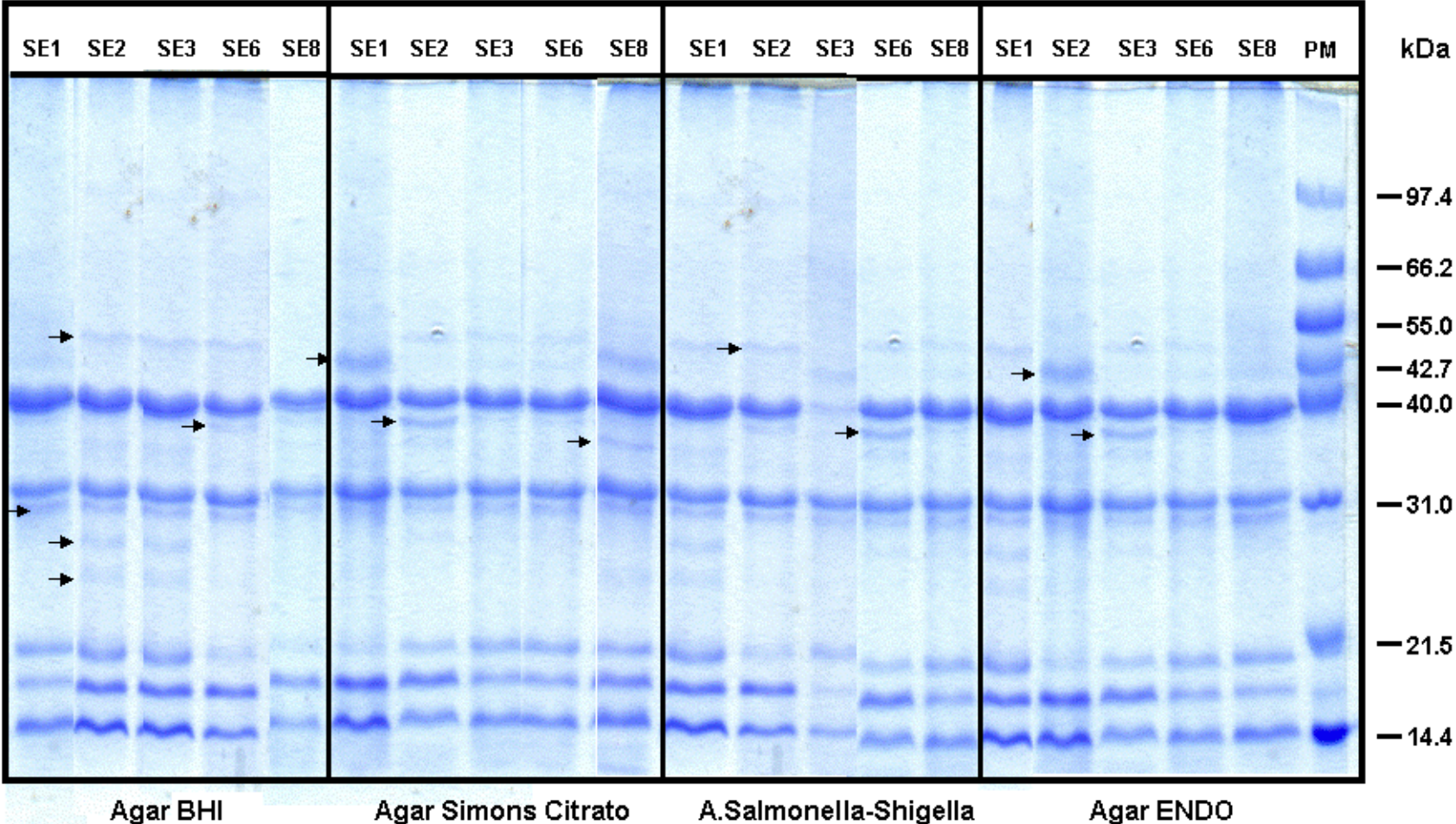
La figura 25 describe el perfil electroforético de los diferentes aislados de *Salmonella entérica spp.* En esta figura se puede observar que cada medio de cultivo ejerce un efecto diferente sobre la expresión de proteínas de membrana en cada uno de los aislados, variaciones indicadas con las flechas de color negro.

Sobre el agar BHI (Brain Infusion Heart), medio de cultivo sin restricción de nutrientes y ausencia de compuestos químicos causantes de estrés se puede observar que los aislados SE-6 y SE-8 presentan decrecimiento de algunas proteínas en el rango de los 30 - 21 kDa; proteínas que son expresadas por los aislados SE-2 y SE-3 acompañadas de una proteína de 42 kDa.

Por su parte, en los medios de cultivo Simons Citrato (SC) y *Salmonella-Shigela* (SS), puede observarse una sobre expresión de proteínas en el rango de los 42.7 – 31 kDa para los aislados SE-1, SE-2 y SE-8; además se observa un incremento en la expresión de una proteína de 21.5 kDa para los aislados SE-6 y SE-8. Sobre el agar SS el aislado SE-3 presenta una marcada desregulación de la expresión de proteína de membrana con respecto los aislados SE-1, SE-2, SE-6 y SE-8 y el aislado SE-6 expresa una proteína de aproximadamente 37 kDa, no expresada en BHI y SC.

Sobre el agar ENDO se observó un patrón de expresión similar para los cinco aislados de SE. Sobre este medio de cultivo, los aislados SE-1 y SE-2 expresaron con mayor avidez proteínas entre 31 – 14 kDa, siendo expresada una proteína de 42 kDa por el aislado SE-2.

Figura 25. Perfil electroforético de proteínas de membrana de los diferentes aislados de SE, inducida por estrés fisicoquímico en diferentes medios de cultivo.



DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

Dentro de la familia de las enterobacterias, *Salmonella Entérica* es el microorganismo más ampliamente distribuido en la naturaleza. Su extraordinaria capacidad de adaptación la ha hecho un patógeno de características excepcionales para sobrevivir en diferentes ambientes, condición que ha permitido al género *Salmonella* colonizar todas las especies vivientes sobre el planeta. La importancia de este género radica en la variedad de reservorios naturales que ha establecido, siendo patógeno de mamíferos como bovinos, caprinos, ovinos, debido principalmente a la cadena trófica, además de especies ovíparas como cetiles y diversas especies aviares. Los insectos, peces, tortugas no son la excepción. (Uzzau S, 2000; Jones TF, 2008; Hilbert, 2012; Horton R.A., 2013)

Dado el carácter ubicuo del género *Salmonella* y su persistencia en forma crónica latente en animales domésticos, hace que los alimentos derivados de la cadena productiva agrícola estén implicados con mayor frecuencia en la aparición de brotes epidémicos. (Cleary, 2010).

De igual forma, como consecuencia del creciente uso de antibióticos en la cadena productiva para el control de plagas y como factor de crecimiento asociados tanto a animales domésticos, como material vegetal (Bean, 1990; Berger, 2010) hacen que el efecto que pueda ejercer un antibiótico o sustancia antimicrobiana sobre una bacteria dependa tanto de la composición química de la estructura de la envoltura celular del microorganismo como de la estructura química del medicamento. Es así como la composición química de la envoltura bacteriana y la estructura química del antibiótico, determinan las propiedades fisicoquímicas involucradas en la capacidad de este último para permear las estructuras celulares y alcanzar el blanco terapéutico. (Nikaido H. T., 1993; Muller, 2004)

El mecanismo inductor de la resistencia a los antibióticos puede ser la exposición del microorganismo al xenobiotico, el cual, incrementa la selección natural de las formas resistentes y activa o incrementa la expresión de cierto número de genes encaminados a disminuir el efecto toxico del antibiótico (Fajardo Quintana, 2012).

Efecto del medio de cultivo sobre la sensibilidad a los antibióticos de aislados de *Salmonella enterica* spp.

Los medios de cultivo ensayados corresponden a medios selectivos y diferenciales, los cuales utilizan inhibidores de crecimiento como el caso de agar ENDO, SS y Mossel o fuente de carbono exclusivas como el agar Simons Citrato, el cual emplea el citrato en lugar de azúcares como fuente de carbono, los cuales causan cierto grado de estrés por los inhibidores de crecimiento de la flora microbiana como colorantes y sales biliares.

En términos generales, los medios de cultivo ENDO y Simons Citrato muestran un efecto antagónico sobre el efecto antibiótico para los cinco aislados, disminuyendo el perfil de sensibilidad (Tabla 3 y Figuras 16 - 20). Efecto como el observado en este trabajo ha sido reportado con anterioridad (Soontornpas, 2005), mostrando cómo varía la respuesta de aislados clínicos de *Pseudomonas* frente al ceftazidime. Si bien estos aislados son sensibles, no todos presentan la misma respuesta a dosis similares del antibiótico. Las pequeñas diferencias observadas no son discutidas a profundidad pero podrían estar asociadas a diferencias en permeabilidad.

La explicación a este fenómeno podría estar relacionada con el estrés causado por los factores fisiológicos de cada paciente, respuesta inmune, inflamatoria, nutricionales, etc., los cuales inducen la expresión de genes relacionados con una respuesta adaptativa de supervivencia que incrementa los sistemas de eflujo y remodelación de la envoltura y por ende afecta el perfil de sensibilidad a los antibióticos (McMahon, 2007; Rowan, 1999).

En este contexto, el efecto más notorio sobre el perfil de sensibilidad a los antibióticos de los diferentes aislados de SE lo ejerció el crecimiento a repetición de los aislados de SE en agar SS y Mossel (tres repiques). Entre los aislados que experimentaron incremento en la sensibilidad a los antibióticos se encontró SE-8, microorganismo que exhibió perfil de multi-resistencia y SE-1. El efecto de estos medios de cultivo sobre la sensibilidad a los antibióticos no es el mismo dependiendo del aislado, lo que podría estar relacionado con el perfil de sensibilidad exhibido por cada uno de éstos frente a los antibióticos y el mecanismo de resistencia asociado. Así, los antibióticos que incrementaron su efecto sobre los aislados de SE por efecto del medio de cultivo fueron Piperacilina/tazobactam, Acido Nalidíxico y Kanamicina. Esta respuesta podría

estar relacionada con el inhibidor de crecimiento común en estos dos medios de cultivo, las sales biliares, componente que ejerce principalmente estrés sobre la envoltura bacteriana, por su efecto detergente (Gunn, 2000; Merritt, 2009; Ding, 2007)

Sin embargo existen reportes que indican que el efecto de sales biliares induce expresión de genes que incrementan la resistencia a los antibióticos en algunos microorganismos. La respuesta del microorganismo al efecto de las sales biliares activa diversas rutas metabólicas que afectan la estructura y composición de la envoltura celular, alterando la permeabilidad del antibiótico. (Chatterjee, 2004; Lin, 2003; Thanassi, 1997; Taranto, 2003)

La alteración de la permeabilidad de la membrana en estos aislados, de acuerdo al medio de cultivo queda en evidencia, al observar el perfil de proteínas de membrana de las diferentes muestras de SE, en el cual se vislumbra que, dependiendo de la presión selectiva del medio de cultivo empleado, bien sea por la presencia de inhibidores de crecimiento, cambio de la fuente de carbono o presencia de sales biliares, se activa o inactiva la expresión de proteínas constitutivas de membrana según el factor de estrés y tipo de aislado; lo cual a su vez, puede tener relación con el perfil de sensibilidad a los antibióticos de cada uno de los aislados (Ariza, 1995; Nikaido, 1998; Nishino, 2009; Nikaido E. Y., 2008).

Un ejemplo de lo anterior es la expresión de proteínas de peso molecular de aproximadamente 42.7 kDa, expresada en SE-1, SE-2 y SE-8; una proteína de 37 kDa expresada en SE-2, SE-3 y SE-6. La desregulación de la expresión de proteínas en el rango de 14 - 21 kDa para algunos de los aislados, como es el caso de SE-1 y SE-3, cuyas variaciones en los perfiles de sensibilidad a los antibióticos y el perfil de proteínas de membrana puede ser apreciado en las figuras 16 a 20.

La variación en los perfiles de sensibilidad a los antibióticos no es uniforme pero podría explicarse por la forma como cada uno de los aislados da respuesta al medio ambiente donde es cultivado y el cual ejerce una respuesta de remodelación de la composición de la estructura de la membrana. En este contexto, la presión selectiva ejercida por el medio ambiente afecta tanto la expresión de sistemas de transporte para nutrientes como fuente de carbono y nitrógeno o de expulsión de sustancias químicas, inhibidores de crecimiento. En este contexto, las proteínas expresadas por

el microorganismo hacen parte de la familia de proteínas pertenecientes al casete ABC (Hosie, 2001; Omori, 2003; Hogan, 2002).

El efecto de los factores quimiotácticos del medio de cultivo y de los flavonoides utilizados en la modificación de la respuesta a los antibióticos, está correlacionada con la expresión de proteínas pertenecientes al casete ABC y que se asocian con factores de multiresistencia (Villagra NA, 2012; Villagra NA H. A., 2008; Davidson, 2004; Seeger, 2009; Velamakanni, 2008).

En este caso se puede decir que los aislados SE-8 y SE-6, que presentan mayor resistencia a los antibióticos fueron los más afectados por los factores quimiotácticos utilizados (Tabla 3 y figuras 19 y 20). De igual forma, el patrón de toxicidad de los medicamentos no antibióticos mostró que la sensibilidad a éstos fue menor para estos dos aislados (Tabla 3), teniendo como única relación con el efecto de los antibióticos la utilización de sistemas de transporte y eflujo pertenecientes al casete ABC, ya que estos medicamentos no poseen blanco terapéutico específico en estos microorganismos.

Adicionalmente, los flavonoides utilizados como factores quimiotácticos mostraron un efecto antagónico frente a los antibióticos ensayados. Este efecto fue más notorio en los aislados que presentaron mayor perfil de sensibilidad a los antibióticos, por ende al no tener éstos un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de estos microorganismos, se puede presumir una posible alteración de la permeabilidad de la membrana. Por el contrario, para el aislado SE-8, el cual presentó en términos generales un incremento en la sensibilidad a los antibióticos, al ser expuesto a los flavonoides, pudo haber incrementado la permeabilidad de la membrana o reducido la actividad de las bombas de eflujo.

CONCLUSIONES

- Los medios de cultivo agar SS y Mossel afectaron de forma sinérgica el perfil de sensibilidad a los antibióticos y de forma antagónica lo hicieron los medios SC y ENDO en los aislados de *Salmonella enterica* (SE).
- El efecto sinérgico de la composición química del medio sobre los antibióticos se evidenció con mayor prevalencia en los aislados SE-8, seguido del SE-6.
- Los compuestos químicos aislados de plantas, conformados preferencialmente por flavonoides mostraron un efecto antagónico de los antibióticos, sobre los aislados SE-1, SE-2, SE-3 y SE-6.
- Los factores quimiotácticos presentes en los diferentes medios de cultivo de los aislados de *Salmonella enterica spp* afectaron con mayor notoriedad la sensibilidad de antibióticos como Piperacilina/tazobactam, Kanamicina y Trimetropin sulfa.
- El efecto de variaciones en el perfil de sensibilidad a los antibióticos en los diferentes aislados de SE mostró tener una relación con la variación en el perfil de proteínas de membrana analizado por SDS-PAGE.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten exponer que la composición química del medio de cultivo afecta la sensibilidad de los aislados de SE a los antibióticos.
- La toxicidad de medicamentos no antibióticos sobre los aislados de *Salmonella enterica spp* utilizados en el presente estudio mostró relación con el perfil de sensibilidad a los antibióticos de cada aislado.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., Emborg, H. D., Pedersen, K., Hendriksen, R. S. and F. Bager. (2001). Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2054-2059.
- Adriaensen, C., De Greve, H., Tian, J.Q., De Craeye, S., Gubbels, E., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Kumar, M. and Hernalsteens, J-P. (2007). A Live *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Vaccine Allows Serological Differentiation between Vaccinated and Infected Animals. *Infection and Immunity*, 75: 2461-2468
- Altekruze, S. F., & D. L. Swerdlow. (1996). The changing epidemiology of foodborne diseases. *Am. J. Med. Sci.* 311:23 - 29.
- Álvarez Ordoñez, A. (2009). Estudio de los factores que determinan la respuesta de adaptación ácida y de protección cruzada frente al calor de *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Senftenberg*: mecanismos implicados. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Archer, D. L. (1996). Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends Food Sci. Technol.* 7:91-95.
- Ariza, R. L. (1995). Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. *Journal of Bacteriol.*, 177:1655–1661.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* Apr 45(4):493–496.
- Baumber, A. (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol.*, 5:318–322.

- Bean, N. H. (1990). Foodborne disease outbreaks in the US 1973-1987. Pathogens, vehicles, and trends. *J. Food. Prot.*, 53:804 – 810.
- Berger, C. N. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology.*, 12: 2385–2397.
- Beuchat, L. R. (2006). Death of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in shelf-stable, dairy-based, pourable salad dressings. *Journal of Food Protection*, 69, 801-814.
- Blackburn, C. D., and A. R. Davies. (1994). Development of antibiotic resistant strains for the enumeration of foodborne pathogenic bacteria in stored foods. *Int. J. Food Microbiol.* 24:125-136
- Brands, D. A., & Alcamo, I. E. (2006). *Salmonella. Deadly Diseases and Epidemics Series.* United States of America: Infobase Publishing.
- Braoudaki, M. and Hilton, A. C. (2004). Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enteric* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *Journal Of Clinical Microbiology.* 42: 73–78
- Brenner, R. G. (2000). *Salmonella Nomenclature.* *J. Clin. Microbiol.* , 38(7):2465.
- Callaway T. R, E. T. (2008). Gastrointestinal microbiol ecology and the safety of ours food supply as related to *Salmonella*. *J Anim Sci* , 86: E163-E172.
- Castaine-Cornet, M. a. (2001). *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20-bp cis-acting sequence control pH and stationary-phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. *Microbiology.*, 147, 709-71.
- Castaine-Cornet, M. P. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.*, 181, 3525-3535.
- CDC (2003). *Salmonella surveillance: annual summary, 2003*
- CDC a. (2006). *Salmonella Annual Sumary.* U.S. Government Printing Office. Washington, D.C.

- CDC b. (1996). Salmonella Surveillance: Annual Tabulation Summary. U.S. Government Printing Office. Washington, D.C.
- CDC. (2000). Surveillance for foodborne-disease outbreaks in United States, 1993 -1997. MMWR 49/SS-1. of Food Microbiology. 30: 325 - 344.
- CDC. (2001). Diagnosis and management of foodborne illnesses: A primer for physicians. MMWR Recomm Rep 50:1-69.
- CDC. (2004). Salmonella Serotype Typhimurium Outbreak Associated with Commercially Processed Egg Salad -Oregon, CDC-MMWR. December 10, 2004 / 53(48);1132-1134
- CDC. (2010). National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Recuperado en Abril 2013, from Salmonella serotype Enteritidis: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/Salmonella_Enteritidis/#infection
- CDC. (2012). Salmonella. Recuperado en Abril de 2013, What is Salmonellosis: <http://www.cdc.gov/Salmonella/general/>
- CDC. b. (2006). Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2005. Atlanta, GA.: Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC-MMWR. (2003). Outbreaks of Salmonella Serotype Enteritidis Infection Associated with Eating Shell Eggs - United States, 1999–2001. January 3, 2003 / Vol. 51 / Nos. 51 & 52
- Chatterjee, A. S. (2004). Effect of bile on the cell surface permeability barrier and efflux system of *Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology., 186:6809–6814.
- Cleary, P. B.-D. (2010). A foodborne outbreak of Salmonella Bareilly in the United Kingdom. Eurosurveillance, 15: 8-10.
- Cooke, F. J., Threlfall, J., & Wain, J. (2007). Current trends in the spread and occurrence of human salmonellosis: molecular typing and emerging antibiotic resistance. En D. M. Mikael Rhen, Salmonella: Molecular biology and Pathogenesis. Horizon Bioscience.

- Cooper, G.L., (1994). Salmonellosis infection in man and the chicken: pathogenesis and development of live vaccines a review. *Veterinary Bull.* 64:123 -143.
- Crosa, J. H. (1973). Molecular relationships among the Salmonellae. *J. Bacteriol.* , 115:307–315.
- Crosby, M.J. (1997). Tesis Magister en Microbiología, Programa Interfacultades de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia
- Crosby, M.J. (1998). Caracterización de proteínas de membrana externa de *E. coli* y *Salmonella enterica* expresadas por estres a factores fisico-químicos.
- Curtiss, R., III, and J. O. Hassan. (1996). Non recombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54:365-372.
- Davidson, A. a. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria.. *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 241–268.
- Davies, R. H., and C. Wray, (1995). Mice as carriers of *Salmonella Enteritidis* on persistently infected poultry units. *Vet. Rec.* 137:337–341.
- De Freitas Neto, O.C., Lopes Mesquita, A., de Paiva, J., Zotesso, F., and Berchieri, A. (2008). Control of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in laying hens by inactivated *Salmonella Enteritidis* vaccine. *Brazilian Journal of Microbiology.* 39:390-396.
- Ding, W. K. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Sci.*, 72: 446–450.
- Ding, W. K. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Sci.*, 72: 446–450.
- Dorman, C. R. (2005). Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. *International Journal of Medical Microbiology.* , 294: 487–502.
- Dorman, C. R. (2005). Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. *International Journal of Medical Microbiology.* , 294: 487–502.

- Ebel, E.D., David, M.J., and Mason, J., (1992). Occurrence of Salmonella Enteritidis in the U.S. commercial egg industry: report on a national spent hen survey. *Avian Diseases* 36:646-654.
- EFSA. (2005). Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004. . European Food Safety Authority.
- El-Gazzar, F. a. (1992). Salmonellae, salmonellosis and dairy foods: a review. *Journal of Dairy Science*, 75, 2327-2343.
- FAO. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo*. Argentina: ISBN 92-5-305150-7.
- FDA. 2006. National Antimicrobial Resistance Monitoring System-Enteric Bacteria (NARMS): 2003 executive report, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD.
- FENAVI-FONAV. (2004). Programa de Estudios Económicos. Balance Anual.
- Fenwick, B., and S. Henry. (1994). Porcine pleuropneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:1334-1340.
- Foley, S. L., & Lynne, A. M. (2007). Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science* , 1-59.
- Forshell, P. &. (2006). Salmonella contamination; a significant challenge to the global marketing of animal food products,. *Rev. Sci. tech. off. int. epiz.*, 25: 541-554.
- Galicia, M., Sandoval, C., Rojas, R., & Magaña, H. (2011). Quimiotaxis bacteriana y flavonoides: Perspectivas para el uso de probióticos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 891-900.
- Gantois I, D. R. (2009). Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev.* 33:718-38.
- Garrity, G., Bell, J., & Lilburn, T. (2004). Taxonomic outline of Prokariotes *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer-Verlag, 2a Edition pp:79-122.

- Gebreyes, W.A. and Altier, C. (2002). Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Swine. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 2813 - 2822.
- Guard-Petter, J. (2001). The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environ. Microbiol.* 3:421-430.
- Gunn, J. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection.*, 2: 907–913.
- Haley, B., Cole, D., & Lipp, E. (2009). Distribution, diversity and seasonality of water-borne *Salmonella* in a rural watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* , 75:1248-1255.
- Hedberg, C.W., David, M.J., White, K.E., MacDonald, K.L., and Osterholm, M.T. (1993). Role of egg consumption in sporadic *Salmonella* Enteritidis and *S. typhimurium* infections in Minnesota. *Journal of Infectious Diseases.* 167:107-111.
- Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 94: 95–102.
- Higgins, R., S. Lariviere, K. R. Mittal, G. P. Martineau, P. Rousseau, and J. Cameron. (1985). Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* 26:86-89.
- Hilbert, F. S.-D. (2012). *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Research International.*, 45: 603–608.
- Hill, C. C. (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal.*, 12, 273-283.
- Hogan, D. a. (2002). Why are bacteria refractory to antimicrobials?. *Current Opinion in Microbiology.* 5:472–477.
- Horton R.A., W. S. (2013). Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. *Research in Veterinary Science*, 95: 45-48.

- Horton R.A., W. S. (2013). Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. *Research in Veterinary Science*, 95: 45-48.
- Hosie, A. a. (2001). Bacterial ABC transporters of amino acids. *Res. Microbiol.*, 152: 259–270.
- Huehn, S., & Malorny, B. (2009). DNA Microarray for Molecular Epidemiology of *Salmonella*. *Methods in Molecular Biology* , Volume 551, 249-285. doi:10.1089/fpd.2007.0075.
- Humphrey, T. (2004). *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nature Reviews* , 2: 504-509.
- Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009). *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella virulence. Cellular Microbiology* , 1579–1586.
- Ibrahim, G.F., Fleet, G.H., Lyons, M.J., Walker, R.A. 1985. Method for the isolation of highly purified *Salmonella* flagellins. *J. Clinical Microbiology*. 22:1040–1044
- Instituto Colombiano Agropecuario ICA. (2010). Normatividad. Obtenido de [http://www.ica.gov.co/Normatividad/Normas-Ica/Resoluciones/2010/2010R1281-\(1\).aspx](http://www.ica.gov.co/Normatividad/Normas-Ica/Resoluciones/2010/2010R1281-(1).aspx)
- Instituto Nacional de Salud - INS. (2005). Distribución de la susceptibilidad antimicrobiana por serotipos y año. Grupo de Microbiología.
- Ishibashi, Y., and T. Arai. 1990. Specific inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella typhimurium* infection. *FEMS Microbiol. Immunol.* 2:35-43.
- Jay, J., Loessner, M., & Golden, A. (2005). *Food Modern Microbiology*. USA: Seventh Edition. Springer Science Pp. 619-639.
- Jones TF, I. L.-D. (2008). Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis.*, 198:109–14.
- Kauffmann, F. (1930). “Serotypes of the genus *Salmonella*”. *Zentralbl. Bakteril. J. Orig.* , 119-152.

- Kauffmann, F. (1966). The bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, Denmark .
- Kauffmann, F., & Edwards, P. R. (1952). Classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon* , 2: 2-8.
- Kieboom, J. a. (2006). Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology.*, 188, 5650-5653.
- Kingsley, R., & Baumber, A. (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: The *Salmonella* paradigm. *Molecular Microbiology* , 85: 112-118.
- Koebnik, R., Locher, K., & Gelder, P. (2002). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* , 37:239–253.
- Kyun Suh, D., Chan Song, J. (2006). Analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolated from human and chickens by repetitive sequence-PCR fingerprinting, antibiotic resistance and plasmid profiles. *J. Vet. Sci.* 7: 37–41
- Lake, A., Hudson, A., & Cressey, P. (2002). Risk profile: *Salmonella* (non typhiid) in poultry (Whole and pieces). *ERS* , 63.
- Landeras, E., M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Mendoza. (1998). Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis: relationship between food, water and pathogenic strains. *Int. J. Food Microbiol.* 43:81–90.
- Leuschner, R. a. (2001). Standardized laboratory-scale preparation of mayonnaise containing low levels of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Food Protection*, 64, 623-629.
- Liebana, E., Garcia-Migura, L., Breslin, M., Davies, R.H. and Woodward, M.J. (2001). Diversity of Strains of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis from English Poultry Farms Assessed by Multiple Genetic Fingerprinting. *J. Clin. Microb.* 39: 154 – 161.
- Lin, J. S. (2003). Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 71, , 4250–4259.

- Lindner, E. (1995). *Toxicología de los alimentos*. Zaragoza España: Acribia. 2da Edición p53-65. ISBN 8420007765, 9788420007762.
- Louis, M.E., Morse, D.L., Potter, M.E., DeMelfin, T.M., Guzewich, J.J., Tauxe, R.V., and Blake, P.A. 1988. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella* Enteritidis infections: new implication for control of salmonellosis. *Journal of the American Medical Association*, 259:2103-2107
- Macovei, L., and Zurek. L. (2006). Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4028-4035
- Makowski, G.S. & Ramsby, M. (1995) . pH Modification to Enhance the Molecular Sieving Properties of Sodium Dodecyl Sulfate 10 % Pol-yacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*. 207: 283 - 295.
- Martínez Álvarez, N. (2007). Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella* enterica. Memoria presentada para optar por el grado de Doctor por la Universidad de Oviedo . Oviedo: Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología.
- Mastroeni, P., Chabalgoity, J. A., Dunstan, S., J., Maskell, D. J. and Dougan, G. (2001). *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet. J.* 161:132-164.
- McMahon, M., Xu, J., Moore, J.E. Blair, I.S. and McDowell, D.A. (2007). Environmental Stress and Antibiotic Resistance in Food-Related Pathogens. *Appl. Envir. Microbiol.*, January 73: 211 - 217.
- Mead, P. S.-r. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5:607-625.
- Melero, M. R. (1994). Nuevo marcador epidemiológico en *Salmonella* enterica subespecie I serotipo Enteritidis. Tesis presentada para optar al grado de doctor en medicina preventiva y salud pública. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Merrill, C.R. (1990). Gel Stainig Techiques. In *Methods in Enzymology* “Guide to protein Purification . Academic press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publisher. New York. Vol 182. Pag 477

- Merritt, M. a. (2009). Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of Medical Microbiology.*, 58: 1533–1541.
- Ministerio de la Protección Social; UERIA; Instituto Nacional de Salud INS. (2011). Perfil de riesgo *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. Imprenta Nacional de Colombia ISBN: 978-958-13-0148-5.
- Muller, M. d. (2004). Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Distribution in Tissue. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 48:1441–1453.
- Nikaido, E. Y. (2008). AcrAB Multidrug Efflux Pump Regulation in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium by RamA in Response to Environmental Signals. *The Journal of Biological Chemistry.*, 283: 24245–24253.
- Nikaido, H. B. (1998). Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those betalactam antibiotics containing lipophilic side chains. *Journal of Bacteriology.*, 180:4686–4692.
- Nikaido, H. T. (1993). Penetration of Lipophilic Agents with Multiple Protonation Sites into Bacterial Cells: Tetracyclines and Fluoroquinolones as Examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 37: 1393-1399.
- Nishino, K. N. (2009). Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. . *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1794: 834–843. .
- Nishino, K. N. (2009). Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. . *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1794: 834–843. .
- Nychas, G., & Tassou. (1996). Growth/survival of *Salmonella* Enteritidis on fresh poultry and fish stored under vacuum or modified atmosphere. *Letters Appl Microbiol* , 23:115-119.
- O'Brien, S., Ward, L., Little, C. and Surman, S. (2003). Increase in *Salmonella* Enteritidis outbreaks in England and Wales [Online]. Available from *Eurosurveillance Weekly* [http:// www.eurosurveillance.org/ew/2003/030828.asp](http://www.eurosurveillance.org/ew/2003/030828.asp)

- Omori, K. I. (2003). Gram-Negative Bacterial ATP-Binding Cassette Protein Exporter Family and Diverse Secretory Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, 95:1-12.
- OPS, USAID, HDM,CD. (2009). Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Lima, Perú.
- Oyarzábal, O. N. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in juice concentrates. *Journal of Food Protection*, 66, 1595-1598.
- Parish, M. (1997). Public health and non-pasteurized fruit juices. *Critical Reviews in Microbiology.*, 23, 109-119.
- Park, Y. B. (1996). Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology.*, 20, 605-611.
- Parra M, D. J. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Montería (Córdoba) Colombia., *MVZ-CÓRDOBA* 2002; 7:(2), 187-200.
- Passaro, D.J., Reporter, R., Mascola, L., Kilman, L., Malcolm, G.B., Rolka, N., Werner, S.B., and Vugia, D.J. (1996). Epidemic *Salmonella* Enteritidis (SE) infection in Los Angeles County, California; the predominance of phage type 4. *Western Journal of Medicine*. 165:126-130.
- Popoff, M. B. (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. 155 (568–570).
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (1999). *Microbiology*. United States of America: McGraw Hill.
- Rabsch et al., 2. R. (2001). Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection.*, 237 - 247. [PubMed: 11358718].
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D. and Farmer, J. J. (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other

- Salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol.* 27:313-320.
- Roberts-Witteveen, A.P., Campbell, B.A., Merritt, T.D., Massey, P.D., Shadbolt, C.T., Durrheim, D.N.(2009). Egg-Associated *Salmonella* Outbreak In An Aged Care Facility, New South Wales, 2008
 - Rodríguez, D.C., Taux, R.V., Rowe, B.(1990). International increase in *Salmonella enteridis*: a new endemic?. *Epidemiol Infection.* 105: 21-27.
 - Rowan, N. J. (1999). Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. . *Trends Food Sci. Technol.*, 10:261–270. .
 - Salton, M. R., & Kim., K.-S. (1996). Structure. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. Chapter 2. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
 - Scheiber.W., N. F. (1987). Fiebre Tifoidea Infectio. *Historia de las enfermedades infecciosas*. Roche Basilea , 139-141.
 - Seeger, M. v. (2009). Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1794:725–737.
 - Sefton, A. M. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance: Their clinical relevance in the new millennium. *Drugs* 62:557-566.
 - Sjölund-Karlsson, M., Folster, J.P., Pecic, G., Joyce, K., Medalla, F., Rickert, R., and. Whichard, J.M. (2009). Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* Isolates from Humans in the United States *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 2142 – 2144
 - Soontornpas, C. S. (2005). Time–kill curves as a tool for targeting ceftazidime serum concentration during continuous infusion for treatment of septicaemic melioidosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 403–407.
 - Tafur JD, T. J. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio.*, 12:217-26.
 - Taranto, M. P. (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Applied Microbiol.*, 95: 86–91.

- Thanassi, D. G. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.*, 179: 2512–2518.
- Thorns, C. (1995). *Salmonella Fimbriae: Novel antigens in the detection and control of Salmonella*. *Br.Vet.J.*, 151, 643-658.
- Thomas, L., & Wimpenny, J. (1996). Competition between *Salmonella* and *Pseudomonas* species growing in and on agar, as affected by pH, sodium chloride concentration and temperature. *International Journal of Food Microbiology.* , 29; 361-370.
- Tsai, C.-M., Frasch, C.E., 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical . Biochemistry.* 119, 115
- Tsang Shiu-Wah, R. (1987). An immunochemical and serological study of surface antigens of *Salmonella Typhi*. Thesis submitted to the University of Hong Kong for the degree of Doctor of Philosophy. Hong Kong.
- Uzzau S, B. D. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect*, 125:229–255.
- Van Oirschot, J. T. 1994. Vaccination in food animal populations. *Vaccine* 12:415-418.
- Van Schaik, W. a. (2005). The role of the stress response of Gram-positive bacteria – targets for food preservation and safety. *Current Opinion in Biotechnology.*, 16, 218-224.
- Velamakanni, S. Y. (2008). Multidrug Transport by the ABC Transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry.*, 47:9300–9308.
- Villagra NA, F. J. (2012). The carbon source influences the efflux pump-mediated antimicrobial resistance in clinically important Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrob Chemother.*, 67:921-927.
- Villagra NA, H. A. (2008). SmvA, and not AcrB, is the major efflux pump for acriflavine and related compounds in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Antimicrob Chemother.*, 62:1273-1276.
- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:439-445.

- Wensink, J. , Gankema, H. , Jansen, W. , Guinee, P. & Witholt, B. (1978). Isolation of The membrane of Enterobacteriogenic strains of Escherichia coli and Distribution of Enterotoxin Activity in Different Subcellular Fractions. *Biochemica et Biophysica Acta*. 514: 128 – 136
- White, D. G., S. Zhao, S. Simjee, D. D. Wagner, and P. F. McDermott. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect*. 4:405-412
- WHO. (2002). Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens. . Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.
- Zamora, H. (2012). Métodos selectos de bioquímica experimental. Bogotá: U. Nacional de Colombia, ISBN 9789587195354.
- Zhang-Barber, L., Turner, A. K. and Barrow, P. A. (1999). Vaccination for control of Salmonella in poultry. *Vaccine*. 17:2538-2545.