

Caracterización genética y patrones de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium en cuyes de crianza intensiva

Genetic characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium in guinea pigs under intensive breeding

Meylin Huamán^{1,5,6}, Crhistian Pérez^{2,5,7}, Jorge Rodríguez^{2,4}, Marjorie Killerby³, Stephane Lovón⁴, Lilia Chauca¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue realizar la caracterización fenotípica y genética de 35 aislados de *Salmonella* Typhimurium provenientes de sistemas de producción de cuyes en la región Lima, Perú, con relación a la resistencia a antimicrobianos. Se determinó el perfil de 11 antibióticos (florfénicol, sulfametoxazol, doxiciclina, oxitetraciclina, amoxicilina, enrofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, ciprofloxacina, colistina y fosfomicina), genotipificación por técnicas de ERIC-PCR y perfil de genes de resistencia a quinolonas (*qnrB*, *qnrD*, *qnrR*, *aa6*), tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*), fenicoles (*cat1*, *cat2*, *cmlA*, *cmlB*) y sulfametoxazol (*sul1*, *sul2*). Los resultados indican la presencia de multidrogo resistencia en un 80% (n=28) de las cepas, siendo la resistencia más común al antibiótico colistina (91.4%), seguido del sulfametoxazol (68.6%) y enrofloxacina (62.9%), y con una moderada resistencia a amoxicilina (20%), ciprofloxacina (20%) y norfloxacina (11.43%). Nueve de 14 genes de resistencia fueron detectados, con una mayor frecuencia de los genes *tetB* (71.4%), *sul1* (57.1%) y *cat2* (48.6%). Se observó la presencia de siete perfiles genéticos diferenciados (A-G) distribuidos en dos clústeres genéticos, siendo el perfil D más frecuente (54.3%) seguido del perfil C (28.6%) de frecuencia. Los resultados sugie-

¹ Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Lima, Perú

² Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), Lima, Perú

⁴ Laboratorio de Microbiología, Bioservice SRL, Lima, Perú

⁵ Ambos autores contribuyeron como primer autor

⁶ E-mail: proyectocuyes01@gmail.com

⁷ E-mail: crhistian.perez@upch.pe

Recibido: 1 de marzo de 2019

Aceptado para publicación: 8 de enero de 2020

Publicado: 31 de marzo de 2020

ren la presencia de cepas de *Salmonella* Typhimurium con moderada variabilidad y perfiles de multidrogo resistencia con la presencia de genes de resistencia, principalmente para tetraciclinas y sulfonamidas.

Palabras clave: *Salmonella typhimurium*, resistencia a antibióticos, genotipificación, ERIC-PCR

ABSTRACT

The aim of this study was to conduct a phenotypic and genetic characterization of 35 *Salmonella* Typhimurium isolates from guinea pig production systems in the Lima, Peru in relation to antimicrobial resistance. The profile of 11 antibiotics (florfenicol, sulfamethoxazole, doxycycline, oxytetracycline, amoxicillin, enrofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin, colistin and fosfomicin), genotyping by ERIC-PCR techniques and quinolone resistance gene profile (*qnrB*, *qnrD*, *qnrD*, *qnrD*, *aa6*), tetracyclines (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*), phenols (*cat1*, *cat2*, *cmlA*, *cmlB*) and sulfamethoxazole (*sul1*, *sul2*). The results indicate the presence of multidrug resistance in 80% (n=28) of the strains, being the most common resistance to the antibiotic colistin (91.4%), followed by sulfamethoxazole (68.6%) and enrofloxacin (62.9%), and with a moderate resistance to amoxicillin (20%), ciprofloxacin (20%) and norfloxacin (11.43%). Nine of 14 resistance genes were detected, with a higher frequency of the *tetB* genes (71.4%), *sul1* (57.1%) and *cat2* (48.6%). The presence of seven differentiated genetic profiles (A-G) distributed in two genetic clusters was observed, the most frequent was the D profile (54.3%) followed by the C profile (28.6%). The results suggest the presence of *Salmonella* Typhimurium strains with moderate variability and multidrug resistance profiles with the presence of resistance genes, mainly for tetracyclines and sulfonamides.

Key words: *Salmonella typhimurium*, antibiotic resistance, genotyping, ERIC-PCR

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por *Salmonella* son consideradas como el principal problema sanitario en sistemas de producción de cuyes (*Cavia porcellus*), siendo el serovar Typhimurium el causante de la infección. La alta tasa de morbilidad (53%) y mortalidad (95%) (Morales *et al.*, 2007), la presencia de portadores asintomáticos, los gastos de tratamiento y la posibilidad de contaminación de la carne o de sus subproductos durante el proceso de eviscerado pueden provocar grandes pérdidas económicas al productor (Kabir, 2010).

El creciente número de reportes de cepas de *Salmonella* Typhimurium resistentes a antimicrobianos constituye un serio problema epidemiológico en el control de la salmonelosis humana y animal (Kabir, 2010; Shu-Kee *et al.*, 2015). La resistencia reportada frente a la familia de tetraciclinas en *Salmonella enterica* es mediada por los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* y *tetG*, que le confieren la capacidad de generar bombas de flujo, protección ribosomal e inactivación enzimática del fármaco (Faldynova *et al.*, 2003); así mismo, es el caso de la resistencia a sulfonamidas mediada por los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* que codifican isoformas del enzima blanco del fármaco (Antúnes *et al.*, 2005).

El genoma de *Salmonella enterica* presenta una plasticidad que le permite adaptarse fácilmente a cambios en su medio ambiente gracias a un incremento en la variabilidad genética y la generación de nuevos serovares o genotipos (Sun *et al.*, 2014). La plasticidad genética presente en cepas de *Salmonella* Typhimurium dificulta el desarrollo de estudios epidemiológicos, más aún considerando las limitaciones de los métodos microbiológicos y serológicos para la identificación y caracterización de las cepas circulantes (Kabir, 2010; Shu-Kee *et al.*, 2015). No obstante, en la actualidad se cuentan con técnicas de tipificación molecular basadas en PCR como REP-PCR, ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – PCR) (Albufera *et al.*, 2009), AFLP o basadas en secuenciamiento como el MLST (Achtman *et al.*, 2012) que permiten detectar la variabilidad y polimorfismos genéticos presentes en *Salmonella enterica* (Prasertsee *et al.*, 2016).

Una gran cantidad de estudios sobre tipificación molecular en *Salmonella* se han realizado en animales domésticos; sin embargo, los estudios en cuyes son insuficientes. Evaluaciones genéticas sumadas a la determinación de patrones de resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* Typhimurium involucradas en uno o más brotes de salmonelosis en cuyes permitiría establecer correlaciones epidemiológicas que ayuden a establecer la causa o posible origen de las infecciones, así como los mecanismos de transferencia de la resistencia antimicrobiana en esta especie, similar a lo realizado en otras especies domésticas (Shu-Kee *et al.*, 2015). El presente estudio reporta una caracterización preliminar de perfiles fenotípicos y genéticos de resistencia a antibióticos y su relación con la variabilidad genética en cepas de *Salmonella* Typhimurium de cuyes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Treinta y cinco cepas provenientes de aislados clínicos de *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) en cuyes obtenidos en 2016 (n=9) y 2018 (n=26) provenientes de la costa central de Lima, Perú, fueron utilizadas para la identificación de perfiles de resistencia antimicrobiana y caracterización genética.

Tres cepas de referencia: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (ATCC® 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC® 14028) fueron utilizadas como controles positivos y negativo. Las cepas de referencia fueron reactivadas siguiendo las instrucciones de uso del fabricante (Microbiologics PI.194.SPAN.LA Rev. A).

Todos los aislados clínicos y las cepas de referencia fueron transferidos a caldos enriquecidos Rappaport Vassiliadis y Muller-Kauffmann Tetrathionate e incubados a 37 °C por 24 horas, y finalmente sembradas en agar selectivo XLD (Xilosa Lisine Deoxycholate). Las colonias sospechosas a *Salmonella* sp fueron subcultivadas en agar no selectivo y posteriormente sometidas al análisis bioquímico, usando una batería de siete agares TSI (Triple Sugar Iron), LIA (Lysine iron agar), citrato de Simon's, urea, rojo de metilo, Voges-Proskauer y SIM (sulfide, indole, motility) y confirmadas por sistema de identificación rápida API (Analytical Profile Index) 20E (BioMérieux). La interpretación de los resultados fue realizada siguiendo lo indicado por la Norma Española UNE-EN ISO 6579-1 (UNE, 2017).

Perfil de Resistencia Antimicrobiana

Una suspensión bacteriana en NaCl 0.8% con una turbidez de 0.5 unidades de escala de McFarland fue utilizada para evaluar la sensibilidad a siete familias de antibióticos: fenicoles (florfenicol, 30 µg), sulfonamidas (sulfametoxazol, 20 µg), tetraciclinas (doxiciclina, 30 µg; oxitetraciclina, 30 µg), penicilinas (amoxicilina, 20 µg), quinolonas (enrofloxacin, 10 µg; norfloxacin, 10 µg; levofloxacin, 5 µg; ciprofloxacina, 5 µg), polimixinas (colistina, 10 µg) y fosfonatos (fosfomicina, 200 µg) mediante el método de disco difusión en agar Mueller Hinton y una lectura de los halos de inhibición dentro de las 18 a 20 horas de incubación a 37 °C, siguiendo lo descrito por el Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (CLSI, 2017).

Extracción de ADN de *Salmonella* Typhimurium

ADN genómico y plasmídico de 35 cepas de *Salmonella* Typhimurium fue obtenido a partir de una colonia resuspendida en buffer fosfato salino (PBS) y extraído mediante el método de membranas de sílica utilizando el kit de extracción de ADN *GF-1 Tissue DNA Extraction* (Vivantis), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN genómico fue almacenado a -20 °C hasta su procesamiento.

Género, Especie y Serovar

La presencia de *Salmonella enterica* fue confirmada en las 35 cepas mediante amplificación por PCR de un fragmento conservado del gen *invA* de 378 pares de bases en un volumen final de 20 µl conteniendo 1X Buffer PCR (Thermo Scientific), 2 mM dNTPs (Thermo Scientific), 2 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 5 pmol de cada cebador (Macrogen), S139: 5' GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA 3' y S141: 5' TCAT-

CGCACCGTCAAA-GGAACC 3' (Rahn *et al.*, 1992; Zahraei, 2005), 0.5 U de Hot Start Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Scientific) y 5 ng de ADN. Las condiciones termales fueron las siguientes: denaturación inicial de 95 °C por 4 min, 30 ciclos (94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s, 72 °C por 30 s), extensión final de 72 °C por 7 min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Life Technologies). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Tris 0.89 M, Borato 0.02 M, EDTA 0.89 M, pH 8.3) durante 45 min a 100 v. y visualizados bajo luz UV.

Adicionalmente, la presencia de *Salmonella enterica* fue confirmada mediante amplificación por PCR de un fragmento de 1464 pares de bases del gen 16S rDNA (Miller *et al.*, 2013) y su posterior secuenciamiento por ambas hebras utilizando *BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Scientific) en el analizador genético ABI 3137 XL (Life Technologies). El servicio de secuenciamiento fue proveído por la empresa Macrogen Inc.

La presencia de *Salmonella* Typhimurium fue determinada mediante la amplificación de un fragmento de 559 bp del gen *fliC* por PCR en un volumen final de 20 µl conteniendo 1X Buffer PCR (Thermo Scientific), 2 mM dNTPs (Thermo Scientific), 1.5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 5 pmol de cada cebador (Macrogen), Fli15: 5' GTGAAA-TTATCGCCACGTTTCGGGCAA 3' y Tym: 5' TCATCGCACCGTCAAA-GGAACC 3' (Soumet *et al.*, 1999), 0.5 U de Hot Start Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Scientific) y 5 ng de ADN. Las condiciones termales fueron las siguientes: denaturación inicial de 95 °C por 4 min, 30 ciclos (94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C a 30 s), extensión final de 72 °C por 5 min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Life Technologies).

DNA Fingerprinting por ERIC-PCR

Perfiles de ERIC-PCR (ADN *fingerprinting* – huella genética) fueron realizados para las 35 cepas en un volumen final de 20 µl conteniendo 1X Buffer PCR (Thermo Scientific), 2 mM dNTPs (Thermo Scientific), 2.5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 5 pmol de cada cebador (Macrogen), ERIC 1R: 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATT CAC- 3' y ERIC 2: 5'-AAGTAAGTGACTGGG GTGAGCG-3 (Albufera *et al.*, 2009), 1 U de Hot Start Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Scientific) y 10 ng de ADN. Las condiciones termales fueron las siguientes: denaturación inicial de 95 °C por 4 min, 30 ciclos (90 °C por 30 s, 40 °C por 1 min, 72 °C por 1 min), extensión final de 70 °C por 8 min.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, TBE 1X, a 100 v durante 1 h. Se realizó un *score* de tamaños de fragmentos mediante comparación con el marcador de peso molecular 100 bp plus (Thermo Scientific) utilizando un Fotodocumentador SmartView Pro 1200 Imager System (Major Scientific).

Perfiles de ERIC-PCR fueron transformados en una matriz de (dis)similaridad utilizando el coeficiente de Jaccard y Dice mediante el programa FAMD v. 1.25 (Schlüter y Harris, 2006), para luego generar un dendrograma bajo el método UPGMA en base a una matriz de distancia genética utilizando los programas FAMD v. 1.25 (Schlüter y Harris, 2006) y Mega v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Detección de Genes de Resistencia

Los genes (n=14) *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(62)-Ib*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *cat1*, *cat2*, *cmlA*, *cmlB*, *sul1* y *sul2* (Cheng *et al.*, 2004) asociados a resistencia a quinolonas (Park *et al.*, 2006; Cavaco *et al.*, 2009; Jacoby *et al.*, 2009), tetraciclinas, fenicoles y sulfamidas (Cheng *et al.*, 2004) fueron amplificados por PCR en un volumen final de 20 µl conteniendo

1X Buffer PCR (Thermo Scientific), 2 mM dNTPs (Thermo Scientific), 2 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 5 pmol de cada cebador (Cuadro 1), 1 U de Hot Start Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Scientific) y 5 ng de ADN. Las condiciones termales fueron las siguientes: denaturación inicial de 95 °C por 4 min, 30 ciclos (94 °C por 1 min, 51 °C por 1 min, 68 °C a 1 min), extensión final de 70 °C por 8 min.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, TBE 1X, a 100 v, durante 1 h. Se realizó un *score* de tamaños de fragmentos mediante comparación con el marcador de peso molecular 100 bp plus (Thermo Scientific) utilizando un Fotodocumentador SmartView Pro 1200 Imager System (Major Scientific).

RESULTADOS

Detección y Confirmación de *Salmonella* Typhimurium

Los 35 aislados presentaron un patrón morfológico en agar XLD y perfil bioquímico compatible con *Salmonella enterica*. La identificación molecular por PCR específica del gen *invA* y del *fliC*, así como del secuenciamiento del gen 16S rDNA confirmaron la presencia de *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Typhimurium en todas las cepas.

Perfil de Resistencia Antimicrobiana

Todas las cepas (100%) mostraron resistencia antimicrobiana al menos a una familia de antibióticos y un 80% de aislados fueron multidrogo resistentes (resistencia al menos a tres familias de antibióticos). Los principales perfiles de resistencia fueron para colistina (91.4%), sulfametoxazol (68.6%), enrofloxacin (62.9%) y una moderada resistencia a amoxicilina (20%), ciprofloxacina (20%) y norfloxacina (11.4%) (Cuadro 2).

Cuadro 1. Secuencias de cebadores utilizados para amplificación por PCR de 14 genes asociados con resistencia a quinolonas, tetraciclinas, fenicoles y sulfamidas

Primer	Secuencia de ADN (5' a 3')	Gen	Tamaño (pb)	Referencia
QnrB-F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	<i>qnr B</i>	469	Jacoby <i>et al.</i> (2009)
QnrB-R	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC			
QnrD-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	<i>qnr D</i>	582	Cavaco <i>et al.</i> (2009)
QnrD-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG			
QnrS-F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	<i>qnr S</i>	417	Jacoby <i>et al.</i> (2009)
QnrS-R	TAAATTGGCACCTGTAGGC			
AAC(6)-Ib-F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	<i>aac(6)-Ib</i>	482	Park <i>et al.</i> (2006)
AAC(6)-Ib-R	CCCGCTTCTCGTAGCA			
TetA-F	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	<i>tet A</i>	210	Chen <i>et al.</i> (2004)
TetA-R	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG			
TetB-F	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	<i>tet B</i>	659	Chen <i>et al.</i> (2004)
TetB-R	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG			
TetC-F	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	<i>tet C</i>	418	Chen <i>et al.</i> (2004)
TetC-R	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC			
TetD-F	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	<i>tet D</i>	787	Chen <i>et al.</i> (2004)
TetD-R	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC			
Cat1-F	CTT GTC GCC TTG CGT ATA AT	<i>cat1</i>	508	Chen <i>et al.</i> (2004)
Cat1-R	ATC CCA ATG GCA TCG TAA AG			
Cat2-F	AAC GGC ATG ATG AAC CTG AA	<i>cat2</i>	547	Chen <i>et al.</i> (2004)
Cat2-R	ATC CCA ATG GCA TCG TAA AG			
CmlA-F	CGC CAC GGT GTT GTT GTT AT	<i>cmlA</i>	531	Chen <i>et al.</i> (2004)
CmlA-R	GCG ACC TGC GTA AAT GTC AC			
CmlB-F	ACT CGG CAT GGA CAT GTA CT	<i>cmlB</i>	394	Chen <i>et al.</i> (2004)
CmlB-R	ACG GAC TGC GGA ATC CAT AG			
Sul1-F	TCA CCG AGG ACT CCT TCT TC	<i>sulI</i>	840	Chen <i>et al.</i> (2004)
Sul1-R	CAG TCC GCC TCA GCA ATA TC			
Sul2-F	CCT GTT TCG TCC GAC ACA GA	<i>sulIII</i>	673	Chen <i>et al.</i> (2004)
Sul2-R	GAA GCG CAG CCG CAA TTC AT			

Nueve de 14 genes de resistencia analizados fueron detectados en las 35 cepas de *Salmonella* Typhimurium, siendo los genes *tetB* (71.4%), *sulI* (57.1%) y *cat2* (48.6%) los más prevalentes (Cuadro 3).

Variabilidad Genética en Aislados de *Salmonella* Typhimurium

Se identificaron nueve bandas (loci) polimórficas comprendidas entre 200 y 2000-

pares de bases con un promedio de 6.714 bandas y 7 perfiles genéticos de ERIC-PCR (A-G), siendo el más abundante el perfil D con 54.3% (19/35), seguido del perfil C con 28.6% (10/35) de la totalidad de cepas (Figura 1).

La totalidad de aislados de 2016 pertenecieron al perfil C a diferencia de los aislados de 2018 donde se aprecia una mayor variación, con la presencia de siete perfiles de ERIC-PCR. Solo el 35.1% de la variación se

Cuadro 2. Perfiles de resistencia de 35 cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de cuyes a 11 antibióticos de siete familias (fenicoles, sulfonamidas, tetraciclinas, penicilinas, quinolonas, polimixinas y fosfonatos) por técnicas de difusión en disco de inhibición

Antimicrobiano	Resistentes		Intermedias		Sensibles	
	%	n	%	n	%	n
Florfenicol	28.6	10	25.7	9	45.7	16
Sulfametoxazol	68.6	24	0.0	0	31.4	11
Doxiciclina	77.1	27	5.7	2	17.1	6
Oxitetraciclina	65.7	23	2.9	1	31.4	11
Amoxicilina	20.0	7	28.6	10	51.4	18
Enrofloxacina	62.9	22	8.6	3	28.6	10
Norfloxacina	11.4	4	0.0	0	88.6	31
Levofloxacina	25.7	9	14.3	5	60.0	21
Ciprofloxacina	20.0	7	14.3	5	65.7	23
Colistina	91.4	32	0	0	8.6	3
Fosfomicina	20.0	7	0	0	80.0	28

Cuadro 3. Presencia de genes de resistencia a quinolonas (*qnr*), tetraciclinas (*tet*), fenicoles (*cat*, *cml*), sulfametoxazol (*sul*) de 35 cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Resistencia	Gen	N	%
Quinolonas	<i>qnr B</i>	7	20.0
	<i>qnr D</i>	8	22.9
	<i>qnr R</i>	0	0
	<i>aa(6)</i>	5	14.3
Tetraciclinas	<i>tet A</i>	10	28.6
	<i>tet B</i>	25	71.4
	<i>tet C</i>	10	28.6
	<i>tet D</i>	0	0
Fenicoles	<i>cat1</i>	0	0
	<i>cat2</i>	17	48.6
	<i>cmlA</i>	0	0
	<i>cmlB</i>	0	0
Sulfametoxazol	<i>sul1</i>	20	57.1
	<i>sul2</i>	5	14.3

explica por diferencias entre los años de colección de las cepas, mientras que el 64.9% de la variación se explica por diferencias

intraespecíficas en las cepas analizadas mediante AMOVA ($V_a= 0.018$, $V_b= 0.034$ y $V_t= 0.052$). Se apreció una moderada diferenciación entre las cepas de *Salmonella* Typhimurium por año de colección ($\Phi_{ST}= 0.3506$), agrupándose al menos en dos clústeres genéticos (Figura 2).

DISCUSIÓN

Perfiles de Resistencia a Antibióticos

Un alto porcentaje de cepas mostraron resistencia a colistina, sulfametoxazol y enrofloxacina, similar a lo reportado para otras especies animales e incluso al humano (Cabrera *et al.*, 2004). La resistencia a las tetraciclinas fue similar a lo reportado en humanos (Onyango *et al.*, 2008). En el presente estudio se corrobora la presencia de los genes *tetA*, *tetB* y *tetC* responsables de conferir el fenotipo de resistencia (Faldynova *et al.*, 2003), pero una mayor frecuencia del gen *tetB* en las cepas provenientes de cuyes en Lima.

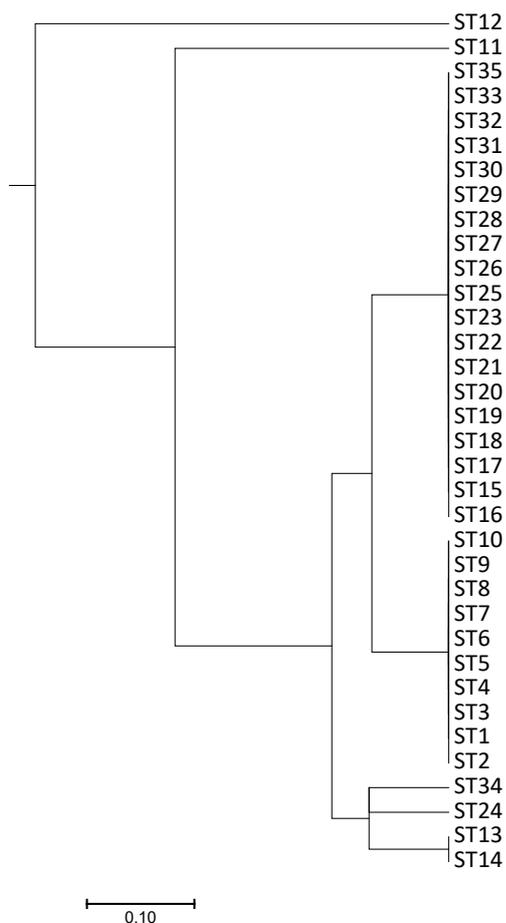


Figura 1. Dendrograma basado en matriz de distancia genética utilizando el coeficiente Standard Jaccard y Dice utilizando método UPGMA para 35 cepas de *Salmonella Typhimurium*

El fenotipo resistente a florfenicol presentó solo el gen *cat2*, presente en cepas de origen humano, a diferencia de lo reportado para otras cepas de origen animal con una mayor presencia del gen *flo* (Nogrady *et al.*, 2005). Por otro lado, en contraste con el estudio de Matsuura *et al.* (2010) y Salvatierra *et al.* (2018) en cuyes de Perú, se observó la presencia de resistencia a penicilinas y sulfonamidas, con porcentajes de resistencia a amoxicilina de 20% y a sulfametoxazol de 68.6%, a pesar de que las penicilinas no se utilizan en los tratamientos médicos en cuyes (Madge, 1969; Young *et al.*, 1987).

El fenotipo resistente a sulfametoxazol en cuyes presentó los genes *sul1* y *sul2*, y con mayor abundancia del primero; similar a reportes en cepas de *Salmonella Typhimurium* de origen animal y humano (Antúnes *et al.*, 2005; Adesiji *et al.*, 2014). Los fenotipos de resistencia a quinolonas (enrofloxacina y ciprofloxacina) fueron muy prevalentes, principalmente en cepas de 2018, duplicando lo reportado por Salvatierra *et al.* (2018). Ambos antibióticos son usados ampliamente en el control de salmonelosis en cuyes (Matssura *et al.*, 2010). Por otro lado, se observó una discordancia entre la presencia del fenotipo de resistencia a la familia de quinolonas y la presencia de genes de resistencia, pudiendo sugerir la presencia de otros genes, mecanismos bioquímicos, o nuevas mutaciones como las producidas en los genes *gyrA* y *parC* relacionados a la resistencia a quinolonas (Nakaya *et al.*, 2003).

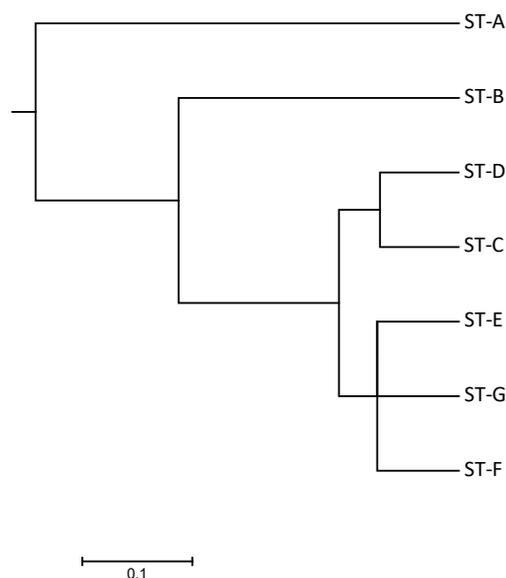


Figura 2. Dendrograma basado en matriz de distancia genética utilizando el coeficiente Standard Jaccard y Dice utilizando método UPGMA para siete patrones de ERIC-PCR en *Salmonella Typhimurium*. Los siete genotipos en las 35 cepas han sido denominados mediante s letras (A-G) para visualizar las relaciones existentes entre los perfiles de ERIC-PCR

Los sistemas de producción aviar constituyen una fuente para la emergencia de las cepas resistentes a antibióticos en *Salmonella enterica* debido al uso de antibióticos en alimentación animal y subdosificación (Verbrugghe *et al.*, 2016). Así mismo, se ha reportado la transferencia de genes de virulencia y resistencia por medio de mecanismos de transferencia horizontal de genes como plásmidos conjugativos, integrones y transposones (Pezzella *et al.*, 2004) entre cepas de *Salmonella* de diferentes orígenes. La posibilidad de contacto entre patógenos de sistemas de producción avícola hacia los sistemas de producción de cuyes es una posible explicación, ya que ambos se concentran en la costa central de Lima.

Variabilidad Genética en Aislados de *Salmonella* Typhimurium

Salmonella Typhimurium constituye la principal serovariedad presente en cuyes, con valores superiores al 95% en comparación con otros serovares (Chero *et al.*, 2017). El presente estudio reporta una moderada variabilidad genética con la presencia de siete patrones de ERIC-PCR distribuidos aleatoriamente en los sitios de muestreo, a diferencia de lo reportado por Salvatierra *et al.* (2018) quienes encuentran un solo perfil genético acorde con una dispersión clonal en granjas de cuyes de Lima. Por otro lado, no se observa una clara correlación entre la variabilidad genética y los perfiles de resistencia antibiótica, similar a lo reportado por Salvatierra *et al.* (2018); sin embargo, contrasta con los resultados de Coculescu *et al.* (2014) sobre genotipos presentes con mayor frecuencia en casos de resistencia a betalactámicos.

La moderada variabilidad y distancia genética existente entre cepas de *Salmonella* Typhimurium pertenecientes a los años 2016 y 2018, sumada a los diferentes patrones de resistencia a los antibióticos podría sugerir un diferente proceso de selección al que fueron expuestas en dicho intervalo las cepas de *Salmonella* Typhimurium en las granjas de cuyes de Lima.

CONCLUSIONES

- El 20% de las cepas de *Salmonella* Typhimurium fueron resistentes a antibióticos de uso humano como ciprofloxacina y amoxicilina, mientras que el 62.9% fueron resistentes a enrofloxacina.
- Las cepas aisladas de *Salmonella* Typhimurium de cuyes presentaron moderados valores de variabilidad genética y una alta prevalencia de cepas multidrogo resistentes (80%), principalmente en los aislados pertenecientes al año 2018.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PNIA 046-PI «Determinación de las causas de mortalidad, control de enfermedades y medidas de prevención en cuyes», Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) y por la Empresa Bioservice SRL.

LITERATURA CITADA

1. **Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, et al. 2012.** Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. Plos Pathog 8: e1002776. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776
2. **Adesiji YO, Deekshit VK, Karunasagar I. 2014.** Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp isolated from human, poultry, and seafood sources. Food Sci Nutr 2: 436-442. doi: 10.1002/fsn3.119
3. **Albufera U, Bhugaloo-Vial P, Issack M, Jaufeerally-Fakim Y. 2009.** Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. Infect Genet Evol 9: 322-327. doi: 10.1016/j.meegid.2007.12.003
4. **Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. 2005.** Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sulI*,

- sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Ch* 49: 836-839. doi: 10.1128/AAC.49.2.836-839.2005
5. [UNE] *Asociación Española de Normalización*. 2017. Norma española UNE-EN ISO 6579-1. Microbiología de la cadena alimentaria, método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp (ISO 6579-1:2017). [Internet]. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0058760>
 6. **Cabrera R, Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Arroyo M, Aladueña A, Usera M, et al.** 2004. Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3934-3939. doi: 10.1128/AAC.48.10.3934-3939.2004
 7. **Cavaco L, Hasman H, Xia S, Aarestrup F.** 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 603-608. doi: 10.1128/AAC.00997-08
 8. **Chen S, Zhao S, White DG, Schroeder CM, Lu R, Yang H, McDermott PF, et al.** 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Appl Environ Microb* 70: 1-7. doi: 10.1128/aem.70.1.1-7.2004
 9. **Chero A, Rosadio R, Marcelo G, Diaz G, Jiménez R, Castro Y, Maturrano L.** 2017. Identificación molecular de *Salmonella typhimurium* en cuyes al primer parto mediante la técnica de PCR múltiple. *Rev Inv Vet Perú* 28: 679-686. doi: 10.15381/rivep.v28.i3.13288
 10. [NCCLS] *Clinical and Laboratory Standard Institute*. 2017. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 2nd ed. M31-A2. *NCCLS* 19(1): 1-87.
 11. **Coculescu BI, Palade AM, Purcarea VL.** 2014. Multiresistance to antibiotics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains producing extended spectrum beta-lactamases (ESBLs). *J Med Life* 7: 80-82.
 12. **Eng SK, Pusparajah P, Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH.** 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 8: 284-293. doi: 10.1080/21553769.2015.1051243
 13. **Faldynova M, Pravcova M, Sisak F, Havlickova H, Kolackova I, Cizek A, Karpiskova R, et al.** 2003. Evolution of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains isolated in the Czech Republic between 1984 and 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2002-2005. doi: 10.1128/aac.47.6.2002-2005.2003
 14. **Jacoby GA, Gacharna N, Black TA, Miller GH, Hooper DC.** 2009. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1665-1666. doi: 10.1128/AAC.01447-08
 15. **Kabir S.** 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int J Env Res Pub He* 7: 89-114. doi: 10.3390/ijerph-7010089
 16. **Madge D.** 1969. Effect of antibiotics on intestinal absorption in guinea pigs. *Comp Biochem Physiol* 30: 295-307. doi: 10.1016/0010-406x(69)90812-3
 17. **Matsuura A, Morales S, Calle S, Ara M.** 2010. Antimicrobial *in vitro* susceptibility of *Salmonella enterica* isolated from guinea pigs of familiar commercial breeding systems in the province of Carhuaz, Ancash. *Rev Inv Vet Perú* 21: 93-99.
 18. **Miller CS, Handley KM, Wrighton KC, Frischkorn KR, Thomas BC, Banfield JF.** 2013. Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PLoS one* 8(2): e56018.

19. **Morales S, Mattos J, Calle S. 2007.** Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) en la dinámica de la infección por *Salmonella enterica* en cobayos. En: XXX Reunión ALPA. Cusco.
20. **Nakaya H, Yasuhara A, Yoshimura K, Oshihoi Y, Izumiya H, Watanabe H. 2003.** Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica typhimurium* with mutations in both *gyrA* and *parC*. *Emerg Infect Dis* 9: 255-257. doi: 10.3201/eid0902.020185
21. **Nogrady N, Gado I, Zsolt P, Paszti J. 2005.** Chloramphenicol resistance genes in *Salmonella enterica subsp enterica* serovar Typhimurium isolated from human and animal sources in Hungary. *Vet Med-Czech* 50: 164-170. doi: 10.17221/5609-VETMED
22. **Onyango D, Machioni F, Kakai R, Waindi EN. 2008.** Multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium isolated from clinical samples at two rural hospitals in Western Kenya. *J Infect Dev Countr* 2: 106-111. doi: 10.3855/T2.2.106
23. **Park C, Robicsek A, Jacoby G, Sahn D, Hooper D. 2006.** Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3953-3955. doi: 10.1128/AAC.00915-06
24. **Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. 2004.** Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 903-908. doi: 10.1128/aac.48.3.903-908.2004
25. **Prasertsee T, Khantaprab N, Yamsakul P, Santiyanont P, Chokesaj-jawatee N, Patchanee P. 2016.** Repetitive sequence-based PCR fingerprinting and the relationship of antimicrobial-resistance characteristics and corresponding genes among *Salmonella* strains from pig production. *Asian Pac J Trop Med* 6: 390-395. doi: 10.1016/S2222-1808(15)61054-4
26. **Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, et al. 1992.** Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probe* 6: 271-279. doi: 10.1016/0890-8508(92)90002-F
27. **Salvatierra G, Rimac R, Chero A, Reyna I, Rosadio R, Maturrano L. 2018.** Resistencia antimicrobiana y genotipificación de cepas de *Salmonella typhimurium* aisladas de cuyes (*Cavia porcellus*) provenientes de granjas de producción intensiva de la ciudad de Lima, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 29: 319-327. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14089
28. **Schlüter M, Harris S. 2006.** Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol Ecol Notes* 6: 569-572. doi: 10.1111/j.1471-8286.-2006.01225.x
29. **Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, Colin P. 1999.** Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol* 29: 1-6. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00559.x
30. **Sun J, Ke B, Huang Y, He D, Li X, et al. 2014.** The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella typhimurium* in Guangdong, China, 2007–2011. *Plos One* 9: e113145. doi: 10.1371/journal.pone.0113145
31. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filip A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
32. **Verbrugghe E, Van Parys A, Haesendonck R, Leyman B, Boyen F, Haesebrouck F, Pasmans F. 2016.** Subtherapeutic tetracycline concentra-

- tions aggravate *Salmonella typhimurium* infection by increasing bacterial virulence. *J Antimicrob Chemother* 71: 2158-2166. doi: 10.1093/jac/dkw152
33. **Young JD, Hurst WJ, White WJ, Lang CM. 1987.** An evaluation of ampicillin-pharmacokinetics and toxicity in guinea pigs. *Lab Anim Sci* 37: 652-656.
34. **Zahraei T, Mahzounieh M, Saeedzadeh, A. 2005.** Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. *Int J Poult Sci* 4: 557-559. doi: 10.3923/ijps.2005.-557.559