UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización fenotípica y molecular de microorganismos aislados de animales en una granja porcícola

Vivian Vanesa Rubio

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2016

Caracterización fenotípica y molecular de microorganismos aislados de animales en una granja porcícola

Vivian Vanesa Rubio

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Director (a):

Ph.D. María Marcela Camacho Navarro

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos Grupo de Investigación:

Grupo de Biofísica y Biología de membranas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2016

A mi "pequeña familia" que me han visto formarme a lo largo de mi vida y siempre están presentes, especialmente a mi madre.. y a Edgar al lado de quien viviré mis siguientes retos….

Agradecimientos

A mi directora de tesis la profe Marcela Camacho por sus enseñanzas, colaboración y ejemplo de amor por la ciencia.

A Yamile Celis por su compañía, apoyo, conocimientos brindados y amistad, antes y durante todo el proceso de la maestría.

Al programa Nacional de Jóvenes Investigadores y la Universidad Nacional de Colombia por la financiación brindada durante el desarrollo de mi maestría, convenio: 0200 de 2014, resolución número 1225.

Al Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud por permitirme el uso del laboratorio de Biología Molecular y reactivos suministrados.

A la Maestría en Ciencias-Microbiología, por la financiación para la secuenciación de genoma completo de un cepa de *E. coli* y la beca de exención de derechos académicos.

A Juan Pablo y mis compañeros del grupo de biofísica y biología de membranas.

A Pilar Donado y el grupo de resistencia a antimicrobianos de CORPOICA, por su apoyo en los muestreos realizados.

A Socorrito, quien su nombre fue predestinado, para ayudar a los estudiantes de la maestría.

A todos aquellos que nos aportaron en conocimientos, papelería, reactivos, cepas…..y paciencia.

Resumen

La resistencia antibiótica es un problema de magnitud mundial. Si bien la OMS alerta sobre éste, en Colombia hay poca información del impacto del uso de antibióticos en la industira agropecuaria y la generación de ésta. Por esta razón este proyecto buscó caracterizar microorganismos aislados de una granja porcícola en la cual se utilizan antibióticos para producción animal.

Se llevó a cabo un estudio de corte transversal en una granja porcícola ubicada en Choachi, Cundinamarca. Se tomaron muestras de hisopado rectal y nasofaíngeo de porcinos, para identificar *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente. Se aislaron las cepas de interés en medios selectivos, se identificó, y evaluó su perfil de susceptibilidad a antibióticos por equipos automatizados Vitek y Phoenix. En los aislamientos con susceptibilidad disminuida a β-lactámicos se identificó la presencia de β-lactamasas y con susceptibilidad disminuida a quinolonas se valoró la presencia de genes plasmídicos, mediante pruebas fenotípicas (método de difusión en agar) y genotípicas (PCR). Se identificaron relaciones genéticas por medio de la técnica rep-PCR y análisis por Diversilab. Se determinaron los tipos de plásmidos circulantes en aislamientos de *E. coli* mediante PCR. Se seleccionó 1 cepa para secuenciación con el fin de buscar genes de virulencia, resistencia e identificar tipo de cepa circulante.

Se recuperaron 64/64 asilamientos de *E. coli* pero sólo 5/241 de *S. aureus*. Se identificó sensibilidad disminuida al menos a un antibiótico en 62/64 de *E.coli* y 5/5 de *S. aureus*. Los porcentajes más altos de resistencia en *E.coli* fueron a ampicilina 28,3% (17/60), cefalotina 58,3% (35/60), colistina 82,8% (49/64), trimetropim sulfametoxazol 35% (21/60) y ampicilina/sulbactam 23% (3/13). También se evidenció resistencia a cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima 4,7%, ceftriaxona 6,25% y a las quinolonas ciprofloxacina 12,5% y levofloxacino 5%. Se identificaron los genes bla_{TEM}, en

11/36, *qnrB* en 7/9, *MCR1* en 45/48, *int123* en 11/64, *sul1* en 5/64, *sul2* en 13/64 y *qacΔ* en 5/64 de las muestras analizadas. Se identificaron los grupos de incompatibilidad IncHI1 en 1/9, Inc I1 en 5/9, IncN en 4/9, IncFIB en 4/9, IncFIA en 1/9, IncP en 1/9, IncY en 1/9, IncA/C en 2/9, IncF en 4/9.

Este estudio muestra la presencia de resistencia antibiótica en la granja porcícola estudiada y su asociación al uso de antibióticos.

Palabras clave: Resistencia a antibióticos, porcinos, perfil de susceptibilidad, genes de resistencia.

Abstract

Antibiotic resistance is a worldwide problem. While WHO warns of this, in Colombia there is little information on the impact of antibiotic use in the agricultural industry and its contribution to resistance. For this reason this project sought to characterize microorganisms isolated from a pig farm in which antibiotics are used for animal production.

A retrospective cross-sectional study was conducted on a pig farm in Choachi, Cundinamarca. Rectal and nasopharigeal swab samples were taken from pigs to identify *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* respectively. Strains of interest were isolated in selective media, identified, confirmed and their antibiotic susceptibility profile evaluated by automated equipment Vitek and Phoenix. In isolates with decreased susceptibility to β-lactam the presence of β-lactamases was evaluated and in those with reduced susceptibility to quinolones the presence of plasmidic genes, using phenotypic (agar diffusion method) and and genotypic (PCR) tests. Genetic relationships were identified by rep-PCR and DiversiLab analysis. Circulating types of plasmids in *E. coli* isolates were determined by PCR. One strain was sequenced in order to search for and identify virulence genes.

64/64 isolations from *E. coli* but only 5/241 of *S. aureus* were recovered. Decreased sensitivity to at least one antibiotic in *E.coli* 62/64 and 05/05 of *S. aureus* was identified. The highest percentages of *E. coli* resistance were to ampicillin 28.3% (17/60), cephalothin 58.3% (35/60), colistin 82.8% (49/64), trimethoprim-sulfamethoxazole 35% (21/60) and ampicillin / sulbactam 23% (3/13). Resistance to third-generation cephalosporins such as ceftazidime 4.7%, 6.25% and ceftriaxone and to the quinolones ciprofloxacin 12.5% and levofloxacin 5% was observed. The genes identified were bla_{TEM}, in 11/36, *qnrB* in 7/9, *MCR1* in 45/48, *int123* in 11/64, *sul1* in 5/64, *qacΔ* in 13/64 and *sul2 in* 5/64 of the samples analyzed. The incompatibility groups identified were IncHI1 in

1/9, IncI1 5/9, IncN 4/9, IncIBF 4/9, IncFIA 1/9, IncP 1/9, IncY 1/9, IncA/C 2/9 and IncF 4/9.

Key findings:
This study shows the presence of antibiotic resistance in the pig farm and its association studied the use of antibiotics.

Keywords: Antibiotic resistance, pigs, susceptibility profile, resistance genes.

Contenido

RESUMEN ..... **IX**

Abstract ..... **XI**

Contenido ..... **XIII**

Lista de figuras ..... **XV**

Lista de tablas ..... **XVI**

Capítulo 1 Resistencia a antibióticos **17**

- **Introducción** **17**
- **Planteamiento del problema** **18**
- **Justificación** **19**
- **Marco teórico** **21**

Capítulo 2 Cepas de Escherichia coli y Staphylococcus aureus resistentes a antibióticos **29**

- **Diseño metodológico** **30**
- **Resultados** **35**

Capítulo 3 Origen de la resistencia a antibióticos en una cepa de Escherichia coli (Ec96) **41**

- **Diseño metodológico** **42**
- **Resultados** **45**

Capítulo 4 ..... **55**

Discusión **55**

Conclusiones y recomendaciones **66**

Anexos **68**

Lista de figuras

Figura 1: Aparición de antibióticos y resistencia a antibióticos..... 22
Figura 2: Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas. 23
Figura 3: Diagrama a escala de la granja en estudio. 31
Figura 4: Rep- PCR. 43
Figura 5: Dendograma de relaciones genéticas de cepas *E. coli* aisladas..... 46
Figura 6: Resistencia a quinolonas. 49
Figura 7: Resistencia a β-lactámicos. 51
Figura 8: Amplificación gen *mcr-1***.** 51
Figura 9: Grupos de incompatibilidad de plásmidos identificados. 52

Lista de tablas

Tabla 1: Ejemplos de algunos antibióticos de uso común. 21
Tabla 2: Frecuencia de microorganismos en el total de infecciones; Hospitales de Nivel III y II de complejidad en la ciudad de Bogotá, 2014. 26
Tabla 3: Descripción y datos de animales de áreas en la granja. 32
Tabla 4: Bacterias patógenas *Staphylococcus spp.* 36
Tabla 5: Bacteria indicadora de microbiota *Escherichia coli.* 37
Tabla 6: Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus.* 38
Tabla 7: Resistencia a antibióticos en *E.coli.* 39
Tabla 8: Perfil de resistencia quinolonas. 49
Tabla 9: Número de cepas con genes *int123, sul1, sul2* y *qacΔ*. 53
Tabla 10: Genes de la cepa *E. coli* EC96. 54

.

Capítulo 1

Resistencia a antibióticos

Introducción

Antes del descubrimiento de los antibióticos, millones de personas morían sin opción terapeútica por estas infecciones. Con el descubrimiento de la penicilina se abrió paso a una época de desarrollo de estos medicamentos pero también a su uso indiscriminado. Décadas después se ha evidenciado que las bacterias generan resistencia a los antibióticos (Torres, 2012).

El uso masivo y no controlado de antibióticos en ambientes clínicos y no clínicos, como granjas donde son usados para producción animal, favorece la resistencia a antibióticos expresada por las bacterias. Se ha llegado a tal punto que existen cepas resistentes a moléculas de última generación, limitando el tratamiento de infecciones severas en humanos, y constituyendo un problema de salud pública, ya que no existen alternativas para combatir estos microorganismos, y la investigación al respecto no ha mostrado nuevas opciones terapéuticas.

Sin embargo, como medida para controlar este aumento en la resistencia a antibióticos, queda la prevención. Por ello organismos mundiales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), trabajan por impulsar la implementación de políticas y programas que apunten a vigilar y controlar el uso de antibióticos, tanto en ambientes clínicos como no clínicos y por ello se debe empezar conociendo cuál es la situación actual de cada país. Este trabajo hace parte de un proyecto macro “Uso de antibióticos para promoción de crecimiento, tratamiento y prevención de enfermedades en animales de producción para consumo humano. ¿Una fuente de resistencia a antibióticos?” y se buscó conocer el perfil fenotípico y molecular de la resistencia a antibióticos expresada por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de la microbiota gastrointestinal de

animales de una granja porcícola de Choachí, Cundinamarca. Se recuperaron muestras de cerdos de las cuales se aislaron bacterias de estas especies algunas de las cuales resultaron multiresistentes por antibiograma. El análisis fenotípico de difusión en agar de aquellos aislamientos resistentes confirma la resistencia. El análisis genético indica la presencia de genes previamente asociados con resistencia a antibióticos.

Planteamiento del problema

La resistencia a antibióticos expresada por bacterias, está ampliamente relacionado con su uso masivo y no controlado. A nivel mundial se han desarrollado programas con el objetivo de lograr control en todos los campos donde son administrados estos fármacos, con el fin de minimizar la cadena de transmisión de estos microorganismos.

A nivel clínico se ha dado mayor control al uso de antibióticos, pero la industria agropecuaria los da para promoción de crecimiento animal con pocas restricciones. En granjas de diferente índole se mezclan alimentos y antibióticos para prevenir enfermedades y promover crecimiento en animales; parte de la comida es consumida por este y otra parte es desechada, favoreciendo la llegada de estas moléculas al ambiente, siendo peor el caso cuando son antibióticos no biodegradables como las quinolonas, que al permanecer mayor tiempo generan presión selectiva y promueven la aparición de microorganismos resistentes (Cabello, 2013).

Más aún, parte del antibiótico consumido es liberado en heces u orina al ambiente, junto con microorganismos resistentes a antibióticos que ingresan en la cadena como fertilizantes para cultivos de alimentos como hortalizas, frutas y vegetales. Este proceso por tanto genera transferencia directa e indirecta de cepas resistentes a antibióticos hacia animales y humanos, a través de aquellos alimentos que no pasan por el proceso de cocción y a través de genes de resistencia a microorganismos ambientales (Durso, 2013).

La contaminación cruzada entre diferentes ambientes favorece la diseminación de la resistencia y por ende las infecciones por microorganismos multirresistentes. Evidencia de la anterior relación se da en Chile, donde se ha postulado que una epidemia de

Salmonella enteriditis resistente a antibióticos que produjo cientos de infecciones humanas, incluso con mortalidad, se originó en la industria avícola y que un factor importante en su origen y diseminación fue el uso indiscriminado de antibióticos (Cabello, 2013).

En Colombia entidades como las Secretarias de Salud y el Instituto Nacional de Salud se encargan de la vigilancia de resistencia a antibióticos en humanos. En animales quien realiza este seguimiento es la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –CORPOICA. Así, existe un Programa de Vigilancia Integrada de la Resistencia Antimicrobiana (COIPARS) a cargo de ICA y CORPOICA que tiene como objetivo monitorear los diferentes eslabones de la cadena avícola, determinando la prevalencia y perfiles de resistencia antimicrobiana de bacterias zoonóticas e indicadoras de origen animal y de alimento de origen animal.

Por otra parte el Instituto Nacional en Vigilancia en Medicamentos y Alimentos-INVIMA, establece los límites de antibióticos permitidos en alimentos para consumo humano, pero no existe un programa de vigilancia que abarque todo el ciclo de transmisión. Por estas razones, este proyecto buscó conocer el perfil fenotípico y molecular de la resistencia a antibióticos expresada por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de la microbiota gastrointestinal de animales de una granja porcícola.

Justificación

El uso inadecuado de antibióticos en distintos nichos, ejerce presión en estos ambientes, llevando a la selección de microorganismos resistentes y al paso de elementos genéticos que movilizan genes de resistencia entre bacterias resistentes y sensibles por transferencia vertical y/u horizontal (Rajic *et al.,* 2006; Celis, 2012). Esto constituye un problema de Salud pública ya que incrementa morbi-mortalidad por infecciones, costos de tratamiento y contaminación del ambiente. Tal es su importancia que la OMS recomienda en la 67ª Asamblea Mundial de Salud, que se establezcan sistemas de vigilancia de la resistencia a antimicrobianos en tres sectores distintos: i) enfermos ingresados en hospitales, ii) enfermos ambulatorios de todos los

establecimientos de atención de salud y la comunidad, y iii) uso de antimicrobianos con animales y otros usos no humanos (WHA67.25, 2014).

En este estudio el modelo de análisis fue una granja porcícola porque en esta industria se han identificado las mayores tasas de resistencia a antibióticos en especial a los de uso clínico, como penicilinas, tetraciclinas y quinolonas, y en menor proporción a cefalosporinas y aminoglicósidos (Hsu *et al.*, 2006), para iniciar la búsqueda de asociaciones causales que den cuenta del uso de antibióticos y cepas de *E. coli y S. aureus* resistentes a estos. Esta información aporta en la comprensión de la transmisión de cepas antibiótico-resistentes y su impacto en medios no hospitalarios. Indica además la necesidad de limitar el uso de antibióticos, con el fin de reducir el riesgo en salud humana y animal y apunta a mejorar la dispoción de residuos y excretas para minimizar su acumulación en el ambiente.

Por otro lado, fue posible mediante métodos moleculares, determinar una cepa *E. coli* circulante en un área con presión antibiótica directa, que es seleccionada en esta área por la presentacia del antibiótico, pero desaparece en la cadena una vez se retira el fármaco. Este estudio permite evidenciar la asociación entre el uso de antibióticos en un ambiente no clínico y la resistencia a estos en microorganismos aislados en dichos sitios. Estos datos permiten sugerir medidas preventivas y correctivas, con el fin de reducir el riesgo en salud humana y animal de la población estudiada.

Marco teórico

Antibiótico

Es la sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de comprometer el desarrollo de ciertos microorganismos o de causar la muerte, por su acción bacteriostática o bactericida respectivamente (Torres, 2012). El primer antibiótico de origen natural descubierto fue la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, y con éste el desarrollo de gran variedad, unos naturales y otros sintéticos, que presentan diferentes mecanismos de acción sobre las bacterias (Tabla 1):

Tabla 1: Ejemplos de algunos antibióticos de uso común.

GRUPO	EJEMPLOS	MECANISMO DE ACCIÓN
AMINOGLUCÓSIDOS	Amikacina, Gentamicina, Estreptomicina	Actúa sobre el ribosoma, inhibiendo síntesis de proteínas
MACRÓLIDOS	Claritromicina, Eritromicina, Espectinomicina	
TETRACICLINA	Tetraciclina, Coxiciclina, Oxitretraciclina	
CARBAPENEM	Imipenem, Ertapenem, Meropenem	Inhibe síntesis de pared celular
CEFALOSPORINAS	Primera Generación: Cefalexina, Cefalotina, Cefazolina	
	Segunda Generación: Cefoxitina, Cefaclor, Cefuroxima	
	Tercera Generación:Cefixima, Ceftazidima, Ceftriaxona	
	Cuarta Generación: Cefepime, Cefaclidina	
	Quinta Generación: Ceftobripol, Ceftarolina	
MONOBACTAMICOS	Aztreozan	
GLICOPEPTIDOS	Teicoplanina,Vancomicina	
PENICILINAS	Penicilina, Amoxicilina, Piperaciclina	
POLIPEPTIDOS	Bacitracina, Colistina, Polimixina B	
QUINOLONAS	Ciprofloxacina, Norfloxacina, Levofloxacina	Inhibe replicación y transcripción ADN
SULFONAMIDAS	Trimetropim-Sulfametazona, Sulfametizol	Inhibe síntesis ácido fólico

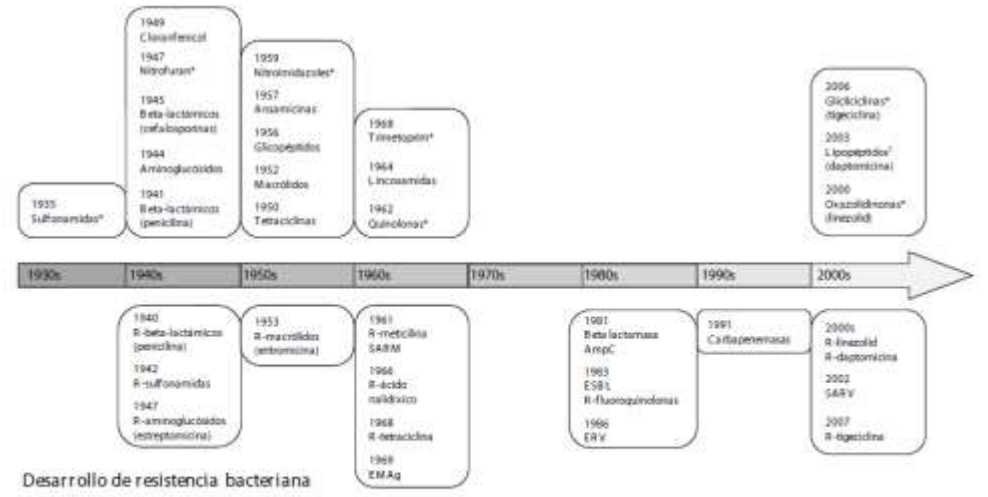
Resistencia a Antibióticos

La resistencia es la capacidad de algunos microorganismos para tolerar la acción de antibióticos, a niveles clínicamente importantes (OMS, 2014). Esta puede ser natural o adquirida; la primera porque hay bacterias que de manera innata tienen genes que le confieren resistencia. Otras son productoras de antibióticos como algunas cepas del género *Streptomyces,* que pueden producir esteptromicina o eritromicina. En el caso de la resistencia adquirida, puede ser por mutación de genes o adquisición de elementos genéticos móviles.

La transferencia de genes de resistencia se puede dar de manera vertical cuando de una célula madre se pasa información genética a la célula hija, generalmente material genético cromosomal. La otra forma es transferencia horizontal de genes de una célula a otra, en donde se pasa material genético extracromosomal, y puede darse entre bacterias de diferente especie o género siendo esta forma la más preocupante, ya que favorece la diseminación de genes de resistencia (Thomas, 2006).

Mecanismos de Resistencia

Figura 1: Aparición de antibióticos y resistencia a antibióticos.



Introducción en el arsenal terapéutico de las distintas familias de antibióticos (se incluyen también los antimicrobianos de naturaleza sintética, marcados con un asterisco) y emergencia de resistencia (R) a los mismos. Asimismo se indican las fechas de detección de mecanismos de resistencia de especial relevancia clínica (BLEE: beta-lactamasas de espectro extendido; ERV: enterococos resistentes a vancomicina; EMAg: enzimas modificantes de aminoglucósidos; SARM: S. aureus resistente a meticilina; SARV: S. aureus resistente a vancomicina). [1]El lipopéptido daptomicina se descubrió en los 80 pero no fue aprobado para su uso por la FDA hasta 2003.

Fuente: Tomado de Torres, 2012.

Las bacterias tienen diferentes formas de resistir el efecto de los antibióticos. De acuerdo al mecanismo de acción de éstos, hay maneras diversas de contrarrestar su efecto, permitiéndoles sobrevivir aún en concentraciones clínicamente considerables. En la figura 1 se observa una línea de tiempo de aparición de algunos de los mecanismos de resistencia a antibióticos descritos a continuación (figura 2).

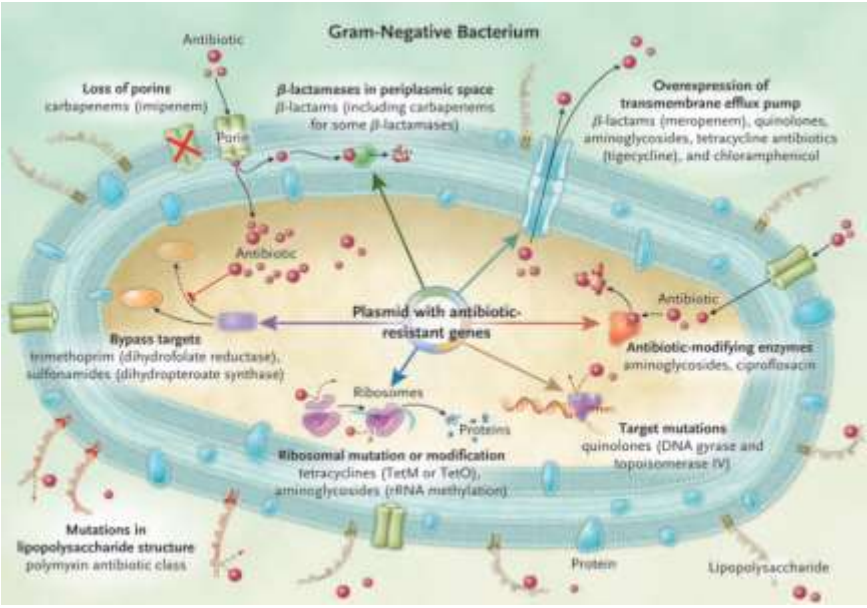
Limitar el ingreso del antibiótico a la bacteria por medio de la pérdida o cierre de porinas o excretar el antibiótico por medio de bombas de eflujo (proteínas transmembranales). Ejemplo: Quinolonas.

Expresar enzimas con la capacidad de modificar el antibiótico, por ejemplo por medio de metilaciones, acetilaciones o fosforilaciones. Expresar β -lactamasas, enzimas que actúan sobre β-lactámicos rompiendo sus enlaces químicos.

Modificar la diana del antibiótico, por ejemplo mutar ribosomas ó liposacáridos cuando éstos son el blanco de acción del antibiótico, por tanto este no puede actuar, ya que no reconoce su sitio de unión.

Suplir vías metabólicas alternativas, por ejemplo cuando el antibiótico altera enzimas esenciales, caso de la Sulfamida, la bacteria utiliza otra ruta para suplir esta pérdida.

Figura 2: Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas.



Fuente: Tomado de Peleg *et al.,* 2010.

Halls & Collins (1995) definen un **integrón** como un elemento dinámico que contiene los determinantes genéticos de los componentes de un sistema de recombinación específica de sitio que reconoce y captura genes en casetes móviles. Tiene un promotor para la expresión de los genes de casete y por tanto actúan como sistemas de clonación natural y/o como vectores de expresión. Puede tener extremos 5' y 3' conservados (CS). El 5' CS es constante y está constituido por un gen *intI,* que codifica para una integrasa, una tirosina-recombinasa, un sitio adyacente de recombinación (*attI*), y al menos un promotor (Pc, P2) (Halls *et al.,* 1994; Halls & Collins, 1995; Di Conza & Gutkind, 2010). La integrasa es la encargada de catalizar la escisión del sitio de recombinación *attI* y la integración específica de los casetes genéticos. La expresión se da gracias al promotor Pc, que está incrustado ya sea en el gen *intI* o en el sitio de *attI* y orientado hacia la zona de integración (Collis & Hall, 1995; Cambray *et al.,* 2010). De acuerdo a la secuencia de amino ácidos de la integrasa se han descrito tres clases de integrones: los de importancia clínica por albergar genes de resistencia y frecuencia son los de clase 1, 2 y 3. Después de esta zona 5' CS se encuentra la región variable donde se albergan los casetes genéticos.

Por último está el extremo 3'CS que varía de acuerdo a la clase de integrón, e incluye genes que confieren a la bacteria resistencia a distintos antibióticos. En el integrón clase 1 se han descrito típicamente los genes *qacE*Δ*1* que dotan de resistencia a compuestos de amonio cuaternario presentes en antisépticos y desinfectantes (Sabate, 2002). Los genes *sul 1, sul 2 y sul 3* determinan resistencia a sulfonamidas. El gen *sul 1* se encuentra generalmente asociado al integrón clase 1. *Sul 2* se ha encontrado en plásmidos no conjugativos o plásmidos transmisibles de multirresistencia (Bean et al., 2005) y *sul 3,* descubierto en cepas de *E. coli* de cerdos (Perreten & Boerlin 2003), y cuya frecuencia ha aumentado en Dinamarca, en estos animales (Hammerum *et al.,* 2006).

En los integrones clase 2, normalmente la región 3'CS contiene 5 genes (*tnsA, tnsB, tnsC, tnsD y tnsE*) involucrados en la transposición del Tn7 (Hansson *et al*., 2002). De otro lado los integrones clase 3 han sido poco aislados, pero los que se han encontrado poseen casetes genéticos que confieren resistencia a antibióticos como *AAC(6)-Ib*, bla_{GES-1}, bla_{IMP-1}. (Collis *et al., 2002;* Correia *et al*., 2003; Xu *et al.,* 2007).

Los **plásmidos** son elementos genéticos extracromosómicos con la capacidad de replicarse de forma autónoma, que contienen genes, normalmente, no vitales para la bacteria (pueden sobrevivir sin ellos), pero confieren ventajas para mantenerse en condiciones adversas (Torres, 2012). Los tamaños de los plásmidos varían desde unos pocos a varios cientos de kilobases y en el número de copias de una a varios cientos por célula (Novik, 1987).

La clasificación de los plásmidos puede ser por su grupo de incompatibilidad (IN) ya que plásmidos con el mismo control de replicación son incompatibles y plásmidos con diferentes controles de replicación son compatibles. Así, cuando a una bacteria con un grupo INC conocido se le transfiere uno desconocido, su expulsión indica que son incompatibles o del mismo grupo, pero si lo mantiene es compatible es decir de grupos diferentes (Datta & Hedges, 1971). La incompatibilidad puede ser valorada también por hibridización con pruebas de DNA que reconocen 19 replicones básicos (Couturier *et al*., 1988).

Microorganismos de importancia clínica valorados en este estudio

Escherichia coli

Bacteria Gram negativa, con forma bacilar, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, descubierta en 1885 por Theodore von Escherich. Se agrupa en 6 cepas clasificadas por su patogenicidad en: *Escherichia coli* enteropatogénica (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA) y de adherencia difusa (ECAD) (Manning *et al.,* 2010; Martin Dworkin, 2006). Esta bacteria puede causar infecciones intestinales y extraintestinales como septicemia, cistitis, neumonía, entre otras. Por tanto es de gran importancia en Salud pública ya que algunas cepas están dentro del rango de las superbacterias; su fácil adaptación y el nicho donde está en contacto con otros géneros de bacterias la favorecen como dice Stuart Levy:

… sabíamos que las bacterias podían resistir a los carbapenemos, pero nunca habíamos visto a *E. coli* adaptarse de forma tan extensiva para vencer a los antibióticos… (Levy, 2013).

De acuerdo a los datos reportados por la Secretaría Distrital de Salud, en su último boletín publicado, *E. coli* es el principal microorganismo causante de infecciones en hospitales Nivel II y III de la ciudad de Bogotá en el año 2014 (Tabla 2; Boletín de Resistencia Bacteriano, 2014).

Tabla 2: Frecuencia de microorganismos en el total de infecciones; Hospitales de Nivel III y II de complejidad en la ciudad de Bogotá, 2014.

Tabla 2. A: Frecuencia de microorganismos en el total de infecciones; Hospitales de Nivel III de complejidad en la ciudad de Bogotá, 2014.

Microorganismo	Número de aislamientos	%
Escherichia coli	1624	20,6
Klebsiella pneumoniae	1318	16,7
Staphylococcus aureus	876	11,1
Pseudomonas aeruginosa	668	8,5
Staphylococcus epidermidis	410	5,2
Proteus mirabilis	319	4,0
Enterobacter cloacae	388	4,9
Enterococcus faecalis	265	3,4
Serratia marcescens	257	3,3
Otros	1772	22,4
Total	7897	100,0

Tabla 2. B: Frecuencia de microorganismos en el total de infecciones. Hospitales de Nivel II de complejidad en la ciudad de Bogotá. 2014.

Microorganismo	Número de aislamientos	(%)
Escherichia coli	19	34,5
Staphylococcus aureus	13	23,6
Proteus mirabilis	6	10,9
Enterococcus faecalis	5	9,1
Staphylococcus epidermidis	4	7,3
Pseudomonas aeruginosa	2	3,6
Staphylococcus sciuri ss. lentus	2	3,6
Citrobacter koseri (diversus)	1	1,8
Serratia marcescens	1	1,8
Stenotrophomonas maltophilia	1	1,8
Streptococcus agalactiae	1	1,8
Total	55	100,0

Fuente: Tomado de: Boletín de Resistencia Bacteriano, 2014. Secretaría Distrital de Salud.

Staphylococcus aureus

Bacteria Gram positiva, con forma de coco agrupada en racimos, descubierta en 1880 por Alexander Ogston, perteneciente a la familia Micrococcaceae. De su género es la especie que causa más número infecciones en humanos. El cuadro clínico que genera puede ser local (cúmulo de pus), o siembra de otros focos a través de sistema vascular, o cuadros asociados a toxinas. En cuanto a las toxinas de *S. aureus*, se conocen 7 serotipos: A, B, C_1, C_2 C_3, D, E. Estas toxinas estafilocócicas pueden generar cuadros como el síndrome de piel escaldada, el síndrome de choque tóxico y el cuadro de intoxicación alimentaria (Echevarria, 2003; Bécquer, 1997).

Actualmente existe la cepa SARM (*Staphylococcus aureus methicillin resistant*), relacionada con infecciones asociadas a la atención en salud (SARM-AH). Sin embargo, desde hace poco tiempo está emergiendo como agente causal de infecciones en la comunidad (SARM-AC). El problema de esta resistencia es que hace difícil su tratamiento. Por ejemplo, la neumonía producida SARM, tiene mortalidad 2,5 veces mayor que la de una cepa susceptible, requiere de hospitalización con más frecuencia y su tratamiento es más costoso (Rubin, 1999).

Este microorganismo es un patógeno que afecta tanto animales como humanos, y hay cepas como la ST398 que ha adquirido genes de resistencia en varios hospederos (Torres, 2012); también es la principal bacteria gram positiva, causante de infecciones (Tabla 2) asociadas a la atención en salud en Bogotá en 2014 en Hospitales de II y III nivel de complejidad (Boletín de Resistencia Bacteriano 2014).

Pregunta de investigación

¿Está el problema de resistencia a antibióticos asociado con el uso se estos medicamentos en producción animal?

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar microorganismos aislados de una granja porcícola en la cual se utilizan antibióticos para producción animal.

Objetivos específicos

1. Recolectar muestras de animales, cultivar y aislar bacterias de las muestras.

2. Establecer el perfil de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos logrados y discriminados por fuente de origen (antibiogramas).

3. Identificar relaciones genéticas de los aislamientos obtenidos (dendogramas).

4. Sugerir el mecanismo genético que explica la resistencia encontrada en aislamientos con resistencia (cromosomal o extracromosomal)

Capítulo 2

Cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos

El uso de antibióticos está relacionado con emergencia y diseminación de infecciones antibiótico-resistentes en animales y humanos (Levy & Marshall, 2004). En el caso de animales de granja, estos fármacos parecen favorecer crecimiento por promoción de ganancia de peso y disminución del costo de alimentación, lo que hace esta práctica frecuente en la producción de aves y cerdos, entre otros animales (Marshall & Levy, 2011; Martinez, 2009). La probabilidad de generar resistencia se asocia con exposición prolongada a un antibiótico determinado. Esta capacidad emerge sólo cuando están presentes los microorganismos resistentes y sus genes de resistencia, los cuales se expresan juntos en un ambiente o microorganismo determinado (Levy & Marshall, 2004).

La presión ejercida por la presencia de antibióticos en un ambiente determinado, puede promover expresión de genes que no estaban siendo expresados (es decir ya presentes en el genoma o en elementos extracromosomales), cambios (mutaciones) en zonas puntuales de genes presentes que se pueden traducir en la expresión de proteínas con estructura diferente que podría alterar la función original, o adquisición de nuevos genes de resistencia por transferencia horizontal (Davies & Davies, 2010). La presencia de microorganismos resistentes en el medio ambiente, implica un gran reservorio de genes de resistencia en la microflora normal humana y animal que pueden potencialmente servir como donantes para la transferencia de resistencia a patógenos humanos, animales y ambientales (Keen & Montforts, 2012; Marshall & Levy, 2011; Martinez, 2009).

En este aparte se presentan los resultados asociados a las muestras recolectadas, los aislamientos logrados y la detección de resistencia antibiótica.

Objetivos específicos asociados

1. Recolectar muestras de animales, cultivar y aislar bacterias de las muestras.

2. Establecer el perfil de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos logrados y discriminados por fuente de origen (antibiogramas).

Diseño metodológico

Recolección de muestras

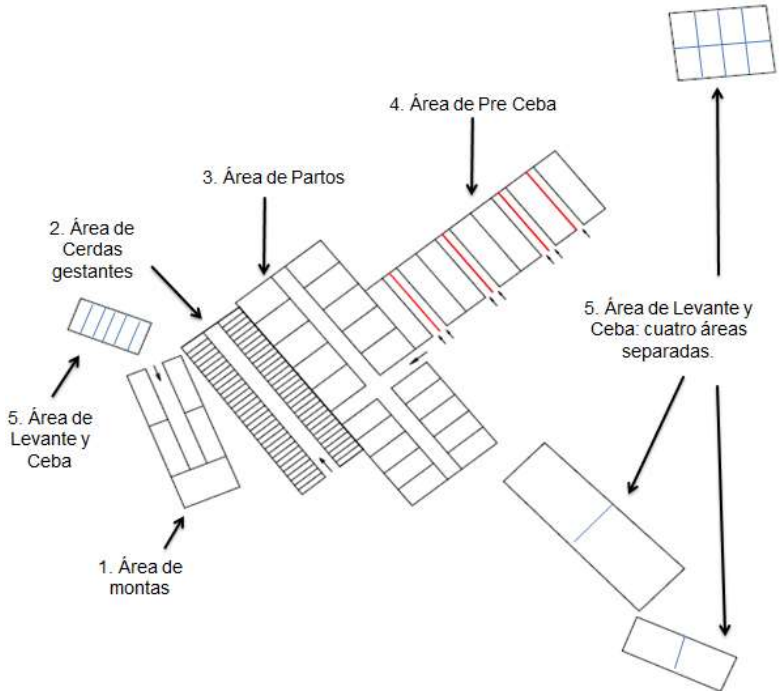
Población de estudio

Este estudio se desarrolló en una granja porcícola ubicada en la vereda Potrero grande, Choachí, Cundinamarca, la cual está a 2100 msnm, a aproximadamente 38 km de la ciudad de Bogotá, con una temperatura promedio de 18°C, a la cual se llega por carretera, la mayor parte de esta es pavimentada (http://www.choachi-cundinamarca.gov.co/informacion_general.shtml) (Figura 3).

La población de estudio fueron cerdos organizados en 5 áreas según la etapa de crecimiento (figura 3; Tabla 3). En el área de montas se encontraban 5 machos, en corrales grandes individuales, donde se pueden movilizar, con pocos residuos en el piso y alimento individual. Estos son los animales más cuidados en la granja y para reemplazarlos son adquiridos de otras fincas. En esta área se lleva a cabo el proceso de fecundación, por tanto las hembras son movilizadas hasta esta área.

Las hembras se encuentran en el área de cerdas gestantes en jaulas individuales pequeñas que limitan su movimiento, con comida individual y pisos con pocos residuos. Aquí hay capacidad para 98 animales, pero en el momento del muestreo sólo había 60. Los primeros 64 días de gestación están en esta área y luego son trasladas al área de partos hasta completar aproximadamente 114 días de gestación.

Figura 3: Diagrama a escala de la granja en estudio.



El área de partos tiene 4 módulos separados por pared, cada uno de los cuales alberga 5 corrales separados por rejas. En cada corral está la jaula de la madre y la de los lechones los cuales pueden pasar de una jaula a la otra. En el momento del muestreo el módulo 4 estaba lleno, con 5 cerdas y sus respectivos lechones, y un corral del módulo 1 (figura 3). Si bien la madre cerda tiene su comida individual, los lechones comparten entre ellos, y no se observan residuos en el área. Como medida profiláctica se administra a los lechones el antibiótico ceftiofur[1], cefalosporina de tercera generación, tan pronto nacen y posteriormente una sulfamida[2], una sulfa, al ser castrados.

Al completar el día 25 los lechones son trasladados al área de preceba con una capacidad máxima de 350 animales pero al momento del muestro sólo habían 244, los cuales estaban en 7 corrales divididos por pared (figura 3), en comunidad por corral, compartiendo la comida. Esta área es menos aseada que las previamente descritas y se encuentran residuos en todos los corrales mezclados con cascarilla. Aquí se administra el antibiótico ciprofloxacina[3], una quinolona, como medida profiláctica, ya que acaban de

[1] La presentación usada en la granja fue Excede
[2] La presentación usada en la granja fue Negasunt
[3] La presentación usada en la granja fue Cefexim

ser retirados de su madre, se asume aumento de estrés y propensión a adquirir infecciones.

Al completar el día 40 los animales en preceba son trasladados al área de ceba donde están hasta que son vendidos. Esta área esta divida en tres espacios ubicados en lugares distintos (figura 3), cuatro corrales grandes se encuentran cerca a las demás áreas, otros 8 están un poco más alejados y otros 6 que están por fuera de la finca. En esta área viven en comunidad, comparten la comida y hay residuos mezclados con cascarilla por todo el suelo. La capacidad total de animales del área es 360 animales pero en el momento del muestreo sólo había 275.

Tabla 3: Descripción y datos de animales de áreas en la granja.

Área	Tipo de animal	Organización	Actividad	Capacidad de la granja	# animales en el momento del muestreo	# de animales a muestrear
Servicio o montas	Machos	Corrales individuales	Monta	5	5	5
Gestantes	Hembras	Jaula individual	Gestación	98	60	30
Partos	Hembras, recién nacidos hasta 25 días	4 módulos cada uno con 5 corrales	Partos y lactancia	220	66	36
Pre-ceba	Cerdos de 26 días hasta 40 días	Galpón dividido en 7 corrales	Crecimiento	350	244	70
Levante y ceba	Cerdos de 41 días hasta 84 días	18 corrales	Crecimiento	360	275	100
			Total		650	241

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con el programa Epi-info 7.1.3 del *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para que fuera representativa, bajo los siguientes parámetros:

Tipo de análisis: Vigilancia de población

Frecuencia de resistencia antibiótica (RA) esperada 50%, dado a que no se conoce la frecuencia de resistencia a antibióticos en microorganismos aislados de animales en granja en Colombia, se selecciona el 50%.

Error absoluto 5%

Nivel de confianza 95%

Tamaño de la población: 650 animales en el momento del muestreo

Total de animales a muestrear: 241

Muestreo

Se tomaron un hisopado rectal y un hisopado nasal por animal, que fueron recolectados en medio de transporte Cary Blair[4] y conservados a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Los procesos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría de Salud Distriral, el Laboratorio de Biofísica del Centro Internacional de Física – CIF asociado a la Universidad Nacional de Colombia y el Laboratorio del grupo de resistencia a antimicrobianos de CORPOICA.

Recuperación de *Escherichia coli*:

Para pre-enriquecimiento bacteriano los hisopados rectales (procesados en *pool* por corral) se cultivaron en 20 mL de agua peptonada bufferada (BPW)[5] a 37ºC por 24 horas. Posteriormente se tomó 1mL de las muestras pre-enriquecidas en agua peptonada y se cultivó en 5mL de caldo *E. coli* (caldo EC)[6], el cual favorece el crecimiento de bacterias fermentadoras de lactosa y las sales biliares inhiben el crecimiento de flora acompañante; se incubaron a 37ºC por 24 horas. Las bacterias coliformes crecen en este medio ya que son lactosa positiva, lo cual se verifica por turbidez del caldo y producción de gas, el cual se observa en una campana de Durham.

Con asa calibrada se tomaron 10uL del caldo EC presuntivos de *E. coli*, sembraron en agar Mac Conkey[7] y se incubaron a 37ºC por 24 horas. Para coliformes se observó crecimiento de colonias rosadas, estás cepas presuntivas fueron cultivadas en

---

[4] Medio de transporte Cary Blair de BBL™: por litro de agua contiene Agar bacteriológico 5,60 g, Cloruro cálcico 0,09 g, Fosfato de hidrógeno disódico 1,1g, Cloruro sódico 5g y Tioglicolato sódico 1,15g. https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L000021(201110).pdf

[5] Medio casa comercial BBL: agua peptonada: se diluye 15 g del polvo en 1 L de agua destilada, cada L contiene: peptona de carne 10 g y cloruro de sodio 5 g (http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/aguapep.htm).

[6] Medio casa comercial (REF), Caldo EC MERCK: Se diluye 37,4 g del medio en 1 L de agua destilada, cada L contiene tripteína 20 g, lactosa 5g, sales biliares 1,9 g, Fosfato dipotásico 4 g, Fosfato monopotásico 1,5 g, cloruro de sodio 5 g. Debe quedar una solución homogénea, se sirve tubos de ensayo con campanas de Durham y se autoclava (http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/ecmedio.htm).

[7] Medio casa comercial OXOID CM0007: Se diluye 52g del polvo en 1 L de agua destilada, por cada L contiene: peptona 20 g, lactosa 10g, sales biliares 5g, cloruro sódico 5 g, rojo Neutro 0,075g, agar 12g (http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0007&org=153&c=uk&lang=EN).

medio sulfuro, indol y motilidad (SIM)[8], donde se evaluaron las pruebas bioquímicas de producción de sulfuro, indol y motilidad para diferenciar *E. coli* de otros coliformes. Como *E. coli* es una bacteria que no produce ácido sulfihídrico el medio se ve transparente del mismo color inical, mientras que en las cepas productoras se ve negro en la parte inferior. *E. coli* produce indol, el cual se evidencia al agregar el reactivo de Erlich o de Kovacs ya que su grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehido reacciona con el indol virando a color rosado la superficie del medio y es móvil lo cual se observa con aumento de la turbidez alrededor del punto de inóculo.

Recuperación de *Staphylococcus aureus*:

Para preenriquecimiento bacteriano, los hisopados nasofaríngeos se cultivaron en 2mL de caldo BHI[9], e incubaron a 37ºC por 24 horas. Posteriormente se tomaron 10uL de caldo BHI con asa calibrada y se sembraron de forma simultánea en agar Baird Parker[10], medio diferencial para *Staphylococcus spp*.; las colonias de *S. aureus* son de color negro por la reducción del telurito a teluro, con borde incoloro y rodeadas de una zona opaca, con una zona clara externa por su reacción sobre la yema de huevo (http://www.oxoid.com). También se sembraron de manera simultánea en Salado Manitol[11] medio selectivo por su alta concentración salina, en la cual pueden crecer los *Staphylococcus spp.*, y los que son coagulasa positiva fermentan el manitol, produciendo

---

[8] Medio comercial, SIM VWR, Se diluyen 30 g del polvo en 1 L de agua destilada, cada L contiene: tripteína 20 g, peptona 6,1 g, sulfato de hierro y amonio 0,2 g, tiosulfato de sodio 0,2 g agar 3,5g . Se mezcla hasta quedar una solución homogénea, calentando y agitando. Hervir un minuto y servir en tubos, esterilizar y dejar solidificar en posición vertical.

[9] Medio casa comercial BD BBL BHI™: Se diluyen 52 g del polvo en 1 L de agua destilada, cada L contiene: Infusión de cerebro y corazón a partir de sólidos 8g, peptidos de tejido animal 5g digerido péptico de tejido animal 5g, dextrosa 2 g, cloruro de sodio 5 g y fostato di-sódico 2,5 g. Se mezcla hasta quedar una solución homogénea, calentando y agitando por 1 minuto, servir en tubos y esterilizar.

[10] Medio casa comercial OXOID CM0275: Se diluyen 63 g del polvo en 1 L de agua destilada, cada L contiene: Triptona 10 g, Lab-Lemco Powder 5g extracto de carne 5 g, extracto de levadura 1 g piruvato de sodio 10 g, glicina 12 g, cloruro de litio 5 g y agar agar 20 g. Hervir para disolver el medio y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Enfriar a 50 ° C y añadir asépticamente 50 ml de yema de huevo Telurito Emulsión (SR0054). Alternativamente, 50 ml de yema de huevo emulsión (SR0047) y 3 ml de potasio telurito 3,5% (SR0030) se puede utilizar. Mezclar bien antes de verter en placas de Petri estériles. (http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0275&org=153&c=uk).

11 Medio casa comercial OXOID CM0085: Se diluyen 111 g del polvo en 1 L de agua destilada, cada L contiene: Lab-Lemco powder1g, Peptona 10 g, Manitol 10 g, cloruro de sodio 75 g, agar 15 g, rojo fenol 0,025 g. Se mezcla hasta quedar una solución homogénea, calentando y agitando 1 ó 2 minutos, esterilizar y servir en cajas de Petri.
(http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0085&org=153&c=uk&lang=EN)

ácidos, cambiando el pH y virando el indicador a amarillo (http://www.oxoid.com), color del cual se ven las cepas de *S. aureus*.

Las cepas presuntivas de *S. aureus* y *E. coli* fueron sembradas en agar BHI, incubadas a 37ºC por 24 horas, que fueron almacenadas en dos viales de cada una.

Identificación y perfil de susceptibilidad de aislamientos

Se confirmó género y especie de las cepas presuntivas *de E. coli* y *S. aureus*, y su perfil de susceptibilidad por equipos automatizados. El primer muestreo se realizó por Vitek 2 y el segundo por Phoenix de acuerdo a recomendaciones del fabricante. Estos dos sistemas se basan en la valoración de pruebas bioquímicas para la fenotipificación.

Vitek 2 funciona con tarjetas separadas para la identificación de género y especie y otra para perfil de susceptibilidad. Cada una tiene 64 pozos donde están distintos sustratos bioquímicos (Anexo 1) en forma deshidratada para detección por técnicas colorimétricas del metabolismo bacteriano identificando hidrólisis enzimática, acidificación, alcalinización y presencia en medio de sustancias inhibidoras (Gobernado y López 2003), y el de resistencia con los antibióticos a evaluar.

Phoenix maneja una sola tarjeta con 51 pozos para identificación por pruebas bioquímicas y enzimáticas y 85 pozos para detección de sensibilidad a antibióticos por diluciones dobles seriadas; la detección se realiza por colorimetría, colorantes-redox y fluorimetría (Gobernado y López 2003).

Para el análisis de susceptibilidad a antibióticos se tuvieron en cuenta los valores (ECOFFs), valores de corte epidemiológico propuestos por EUCAST.

Resultados

Microorganismos identificados

El informe de Phoenix y Vitek en la identificación del microorganismo indica género y especie de la muestra y da el porcentaje de probabilidad de que esta identificación sea correcta (Anexo 2).

Staphylococcus aureus

Se tomaron 241 hisopados nasofaríngeos, con el fin de identificar *Staphylococcus aureus*. Las muestras se mantuvieron individuales porque se buscaba conocer la frecuencia, en vista de que no se conoce para este ambiente. A partir de estas muestras fue posible identificar *S. aureus* en 2,07% (5/241) en el área de cerdas gestantes y *S. schleiferi ssp coagulans* 0,41% (1/241) en el área de partos (Tabla 4).

Tabla 4: Bacterias patógenas *Staphylococcus spp.*

Área	Número de animales muestreados	Hisopados Nasales Recolectados	Número de aislamientos	Microorganismo identificado
Montas	5 machos	5	0	-
Cerdas Gestantes	30 hembras	30	5	*S. aureus*
Partos	6 cerdas (madres) 30 recién nacidos	36	1	*S. schleiferi ssp coagulans*
Área de Preceba	70 cerdos	70	0	-
Área de Ceba	100 cerdos	100	0	-
Total	241	241	6	-

Escherichia coli

Se recolectaron 64 muestras para el aislamiento de *E. coli,* de estas 41 corresponden a hisopados rectales individuales y 23 a muestras en *pool*. Las muestras individuales corresponden a machos del área de montas, cerdas gestantes y madres de área de partos porque al estar en ambientes individuales aislados se podía asociar cada muestra con un individuo. Las muestras en *pool* fueron para animales que se encontraban compartiendo corral como los recién nacidos (edad hasta los 25 días), cerdos en preceba (edad > 25 días a 40días) y ceba (edad >40 días hasta 84 días) en donde era limitada la posibilidad de asociar muestra/individuo. A su vez se hicieron pooles de 5 o 10 muestras dependiendo de la cantidad de animales por corral. A partir de estas muestras fue posible identificar *E. coli* en todas las procesadas 64/64 (Tabla 5).

La metodología utilizada permitió la recuperación de este microorganismo de estudio en todas las muestras tomadas, resultados que se esperaban ya que este es flora normal del tracto gastrointestinal.

Tabla 5: Bacteria indicadora de microbiota *Escherichia coli.*

Área	Número de animales muestreados	Total muestras	Número de aislamientos	Microorganismo identificado
Montas	5 machos	5 Hisopados rectales	5	*E. coli*
Cerdas Gestantes	30 hembras	30 Hisopados rectales	30	*E. coli*
Partos	6 cerdas (madres) 30 recién nacidos	6 Hisopados rectales individuales de madres 6 pool de 5 Hisopados rectales de recién nacidos	12	*E. coli*
Preceba	70 cerdos	7 pool de 10 hisopados rectales	7	*E. coli*
Levante y Ceba	100 cerdos	10 pool de 10 hisopados rectales	10	*E. coli*
Total	241	64	64	*E. coli*

Perfil de susceptibilidad de *E. coli* y *S. aureus*

Tanto el Vitek (Anexos 2) como el Phoenix reportan los antibióticos evaluados, junto con la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la clasificación como sensible, intermedio o resistente, de acuerdo a los puntos de corte establecidos en el equipo. Para Colombia se utilizan los lineamientos dados por el *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). El equipo Vitek también evalúa la presencia de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), pero no muestra la CMI específica para amoxicilina clavulonato.

Basados en los análisis en Vitek y Phoenix se obtuvieron las CMI de cada antibiótico, por microorganismo, teniendo en cuenta los puntos de corte clínicos y valores de corte epidemiológicos propuestos por EUCAST (ECOFFs), se tomanron como resistentes aislamientos que sobre pasen el corte de sensibilidad propuesto por EUCAST. De acuerdo a esta consideración se presentan los perfiles de resistencia encontrados.

S. aureus

Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* (5/5) presentaron resistencia a tetraciclina y clindamicina (Tabla 6). Sólo para 1 de 5 aislamientos se reportó resistencia a gentamicina, minociclina y penicilina G. Todas las cepas estudiadas de esta bacteria (5/5) fueron sensibles a β-lactámicos (cefoxitina, oxacilina), Lipopéptido (daptomicina),

macrólidos (eritromicina), aminoglucósidos (estreptomicina SIN, gentamicina SIN), quinolonas (levofloxacino, moxifloxacino), oxazolidinonas (linezolida), nitrofurantoína, , quinupristina-dalfopristina, rifamicinas (rifampicina), trimetropin-sulfametoxazol y (glicopéptido) vancomicina.

Tabla 6: Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus.*

Antibióticos	Cepas resistentes n=5
Clindamicina	5
Gentamicina, un aminoglucósido	1
Penicilina G, un β-lactámico	1
Tetraciclina, una tetraciclina	5
Minociclina, una tetraciclina de > espectro	1

E. coli

De estas bacterias aisladas se obtuvo el perfil de susceptibilidad a antibióticos, en donde 64/64 aislados de *E. coli* fueron sensibles al aminoglucósido amikacina, a la cefalosporina de cuarta generación cefepime, a los β-lactámicos piperacilina y tazobactam (penicilinas) y a ertapenem, imipenem, doripenem y meropenem (carbapenémicos).

De los aislamientos de *E. coli* recuperados de hisopado rectal de animales 96,9% (62/64) presentaron resistencia a al menos un antibiótico (Tabla 7). Una cepa del área de cerdas gestantes es sensible a todos los antibióticos evaluados. La resistencia más alta se presentó a colistina 82,8% (53/64), una polimixina, la cual es de gran interés ya que este es uno de los antibióticos que se considera de última opción terapéutica en humanos para microorganismos multiresistentes, aunque en la granja no se reporta el uso de este medicamento se considera que debe haber algún factor que genere presión antibiótica a este en todas las áreas, y se sugiere el alimento el cual venden premezclado con este antibiótico. Cefalotina en 59,3% (37/64), un β-lactámicos (cefalosporina de primera generación), usada en humanos, la presencia de β-lactamasas de amplio espectro podría justificar este tipo de resistencia, y trimetropin sulfametoxazol 34.3% (22/64). La resistencia a estos tres antibióticos se encuentra diseminada por todas las áreas de la granja.

En el área de montas se evidenció resistencia a colistina 5/5, trimetropin sulfametoxazol 4/5, cefalotina 1/5 y ciprofloxacina 1/5. En el área de cerdas gestantes las tasas de resistencia más alta se evidenciaron a colistina 24/30, cefalotina 16/30 y trimetropin sulfametoxazol 8/30.

Tabla 7: Resistencia a antibióticos en *E.coli.*

Familia de antibióticos	Antibióticos	Sigla	Montas n=5	Cerdas gestantes n= 30	Partos n=12	Pre ceba n= 7	Ceba n=10	Total n=64
Betalactámicos	Ampicilina	AMP	0	5	3	6	6	20
	Cefalotina	CEP	1	16	10	6	5	38
	Cefoxitina	FOX	0	0	3	0	0	3
	Ceftazidima	CAZ	0	0	3	0	0	3
	Ceftriaxona	CRO	0	0	3	1		4
	Cefuroxima	CXM	0	0	3	0	0	3
	Aztreonam	ATM	0	0	3	0	0	3
	Amoxicilina-Clavulanato	AMC	0	0	3	0	0	3
	Ampicilina-sulbactam	SAM	0	0	0	4		3
Quinolonas	Ciprofloxacino	CIP	1	2	0	3	2	8
	Levofloxacino	LVX		1	0		2	3
Polimixina	Colistina	COL	5	24	9	5	10	53
Aminoglucósido	Gentamicina	GEN	0	0	0	1		1
Nitrofurano	Nitrofurantoína	NIT	0	1	1	0	2	4
Tetraciclina	Tigeciclina	TGC	0	1	0	0	1	1
Trimetroprim-Sulfonomida	Trimetropin-Sulfametoxazol	SXT	4	8	4	3	3	22

En el área de partos las tasas de resistencia más altas fueron a colistina 12/12, cefalotina 10/12, y trimetropin sulfametoxazol 4/12. Adicionalmente hay 3/12 cepas aisladas de pool de hisopado rectal de los lechones que presentan resistencia a la mayoría de β-lactámicos evaluados, como cefalosporinas de segunda (cefoxitina, cefuroxima) y tercera generación (ceftazidima, ceftriaxona), inhibidores de BLEEs (amoxacilina clavulanato) y monobactámicos (aztreonam). Este perfil de resistencia no se observó en otras cepas de la granja y por tanto se sugiere la presencia de un mecanismo de resistencia distinto al de los otros aislamientos, como β-lactamasas tipo ampC o IRT.

Las tasas más altas de resistencia en el área de pre-ceba fue a ampicilina 6/7, cefalotina 6/7, colistina 5/7, ampicilina -sulbactam 4/6, ciprofloxacina 3/7 y trimetropin sulfametoxazol 2/3. En el área de ceba a colistina 10/10, ampicilina 6/10, cefalotina y 5/10, trimetropin sulfametoxazol 3/10.

Con los datos presentados es posible establecer que hay cepas antibiótico resistentes circulando en la granja de estudio y que algunas de estas se pueden asociar directamente con los antibióticos cuyo uso fue reportado. Para sugerir el origen de la resistencia encontrada se hicieron estudios verificando la presencia de genes asociados.

Capítulo 3

Origen de la resistencia a antibióticos en una cepa de *Escherichia coli* (Ec96)

El genoma bacteriano está compuesto por un cromosoma, donde se encuentra toda la información genética necesaria para el ciclo de vida de la bacteria (información que es heredada verticalmente por la progenie celular), y elementos genéticos transferibles. Entre estos últimos se encuentran plásmidos, secuencias de inserción, transposones e integrones, donde se ubican genes que, bajo ciertas circunstancias favorecen supervivencia; ejemplo de estos genes están los que confieren resistencia a antibióticos que al expresarse generan tolerancia a éstas moléculas. (Lederberg, 2000).

La diseminación y expansión de bacterias resistentes es evidencia en tiempo real de evolución en respuesta a la presión dada por el uso terapéutico y no terapéutico de antibióticos. Este fenómeno refleja el proceso típico de adaptación y selección de microorganismos a través de mutaciones y/o adquisición de nuevo material genético (Davies & Davies, 2010; Koonin & Wolf, 2009).

Objetivos específicos

3. Identificar relaciones genéticas de los aislamientos obtenidos (dendogramas).

4. Sugerir el mecanismo genético que explica la resistencia encontrada en aislamientos con susceptibilidad antibiótica disminuida (cromosomal o extracromosomal)

Diseño metodológico

Extracción de DNA de *E. coli*

El DNA genómico fue obtenido usando *GeneJet Genomic DNA purification kit,* siguiendo las recomendaciones del fabricante. El día anterior a la extracción se repicaron las cepas en agar Mueller Hinton, verificando su pureza. Se evalúo la concentración y calidad de DNA obtenido por espectrofotrometría con un equipo Nanodrop 1000 de Thermo Fisher Scientific (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0721), usando el cociente 260/280.

Extracción DNA plasmídico

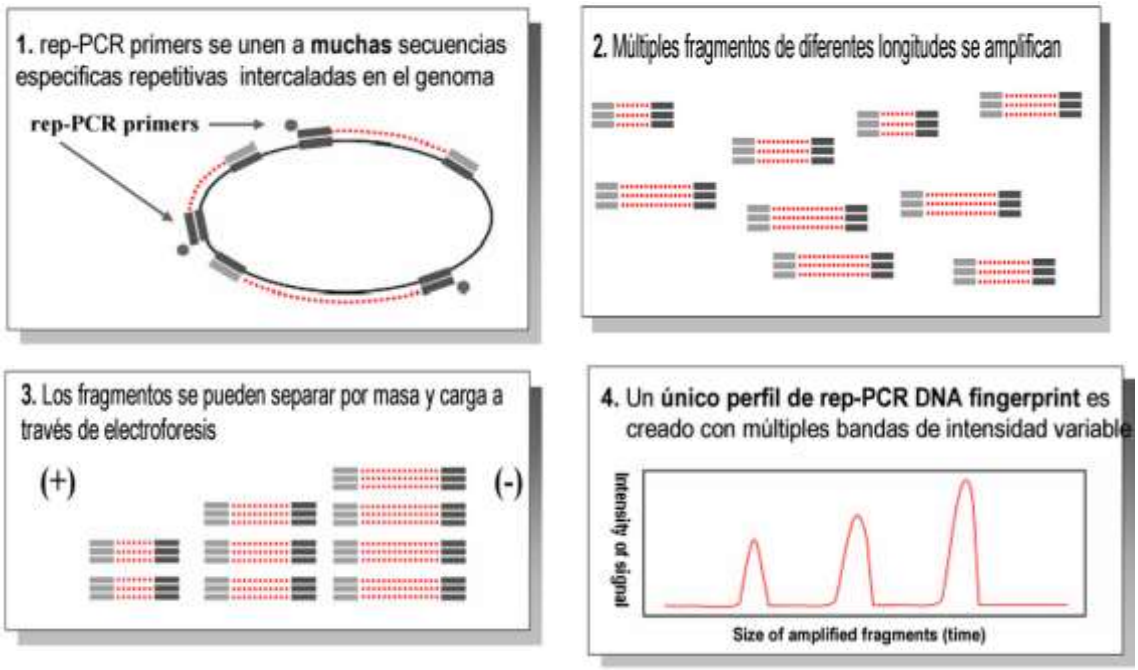
Se realizó extracción de DNA plasmidico por medio de *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* #K0502, #K0503 (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se evidenció por electroforesis en gel de agarosa, con el intercalante Bromuro de etidio y con el buffer TBE. Las imágenes fueron captadas en el Visualizador de imágenes.

Amplificación por Rep-PCR y análisis de perfiles electroforéticos por el sistema Diversilab (dendogramas)

Con el fin de obtener las relaciones genéticas para conocer la similitud de las cepas, se amplificó DNA por medio de la técnica Rep-PCR propuesta por Versalovic *et al.,* (1991), la cual utilizó *primers* que reconocen los elementos repetitivos palindrómicos extragénicos y amplifican el área de DNA entre estas regiones (Figura 4), obteniéndose fragmentos de diferentes tamaños exclusivos de cada microorganismo. Se evaluó la calidad de los iniciadores sugeridos en este trabajo con el programa *primer-BLAST.* La mezcla para la Rep-PCR se estandarizó teniendo en cuenta las características de los reactivos utilizados, con la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific) y se estandarizó el protocolo de amplificación en el termociclador C1000® de Bio-Rad Laboratories (Anexo 3).

El producto de la Rep-PCR fue analizado por el sistema DiversiLab™ de Biomerieux, el cual se basa en electroforesis de microfluido, que tiene el mismo fundamento de la electroforesis convencional, separando fragmentos de DNA por tamaño y carga, pero utilizando sólo 1uL de la muestra en un LabChip y un láser es el que detecta el intercalante en el DNA. Este proceso se llevó a cabo en el bioanalizador Agilent 2100 siguiendo las condiciones del fabricante.

Figura 4: Rep- PCR.



Fuente: http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG_CLN_PRD&doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_53&pubparams.sform=6&lang=es_ar

Pruebas fenotípicas de cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas y β-lactámicos

Para identificar patrones que sugieren resistencia a nivel cromosomal o plásmidíco a quinolonas, se realizó la prueba fenotípica por el método de difusión en agar con ácido nalidíxico y ciprofloxacina, de acuerdo a lo descrito por el grupo SEIMC (2011).

Por medio de pruebas fenotípicas por el método de difusión en agar se buscó la presencia de BLEE y β-lactamasas de tipo AmpC, en cepas seleccionadas por su perfil de susceptibilidad disminuida a β-lactámicos. Para la búsqueda de BLEE se realizó la prueba confirmatoria establecida por CLSI (CLSI 2015), la cual se basa en la prueba de

disco de β-lactámico de tercera generación combinado con el inhibidor. Para la búsqueda de AmpC se realizó una prueba de sinergia de disco con β-lactámico de tercera generación e inhibidor de la Ampc de acuerdo a lo descrito por el grupo SEIMC (2011).

PCR para la identificación de genes de resistencia a antibióticos, grupos de incompatibilidad plasmídico e integrones.

Para sugerir el mecanismo de resistencia de algunos antibióticos evaluados se utilizaron *primers* (Anexo 3) reportados en la literatura. Para quinolonas los reportados por Chen *et al.,* (2012), para los genes *qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD, qepA, oqxA, oqxB* y *aac(6')-Ib.* Para β-lactamasas se llevó a cabo la metodología propuesta por Dallenne *et al*., (2010) para los genes bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{OXA}, bla_{CTXM}, bla_{AAC}, bla_{FOX}, bla_{MOX}, bla_{LAC}, bla_{CMY}, bla_{BIL}, bla_{DHA}, bla_{MIR}, bla_{GES}, bla_{VEB} *y* bla_{PER}. Para colistina se siguió la metodología propuesta por Liu *et al.,* (2016), para el gen *MCR-1*. Con el fin de identificar la presencia de integrones se siguió la metodología propuesta por White *et al*., (2000) para el gen *int123* y por Senz *et al.*, (2004) para *sul 1, sul 2* y *qacΔ.* Y para identificar los grupos de incompatibilidad de los plásmidos, se siguió la metodología descrita por Carattoli *et al.,* (2005) donde se identificaron 18 grupos de incompatibilidad IncHI1, IncHI2, IncI1, IncX, IncN, IncL/M, IncFIA, IncFIB, IncW, IncP, IncY, IncFIC, IncA/C, IncT, IncFIIAs, IncF, IncK y IncB/O. Se evaluó la calidad de los iniciadores sugeridos por el programa *primer-BLAST.*

La metodología fue PCR convencional, la mezcla se estandarizó teniendo en cuenta las características de los reactivos utilizados, la enzima Platinum® Blue PCR SuperMix de Thermo Scientific para la identificación de los genes con resistencia a quinolonas y con la con la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase de Thermo Scientific para las otras PCR. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador C1000® de Bio-Rad Laboratories (Anexo 3). Los productos de PCR, se separaron por electroforesis en gel de agarosa, con el intercalante bromuro de etidio. Las imágenes fueron captadas en el visualizador de imágenes de general electric.

Secuenciación

Se seleccionó la cepa *E. Coli* Ec96 la cual se recuperó del área de partos para secuenciación del genoma completo por Ilumina HiScanSQ. El servicio de secuenciación

fue contratado con el Centro Internacional de Genómica Microbiana, Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA), de la Universidad del Bosque para lo cual se obtuvo a apoyo de la Maestría en Ciencias – Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia.

La extracción de DNA se realizó con *QIAmp kit de QIAGEN*, la calidad fue evaluada por espectrofotometría, los adaptadores de illumina empleados fueron index S503 - N704, la preparación de librerías genómicas se realizó con el kit comercial Nextera XT de illumina. La secuenciación ADN se realizó en plataforma illumina empleando el secuenciador de escritorio MiSeq (ciclos: 250 PE). El trimming de reads y ensamblaje de genomas se realizó empleando el programa CLC Genomics Workbench v8.5.1 (QIAGEN) y la anotación de genomas se realizó empleando el servidor RAST Rapid Annotations using Subsystems Technology V2.0.

Resultados

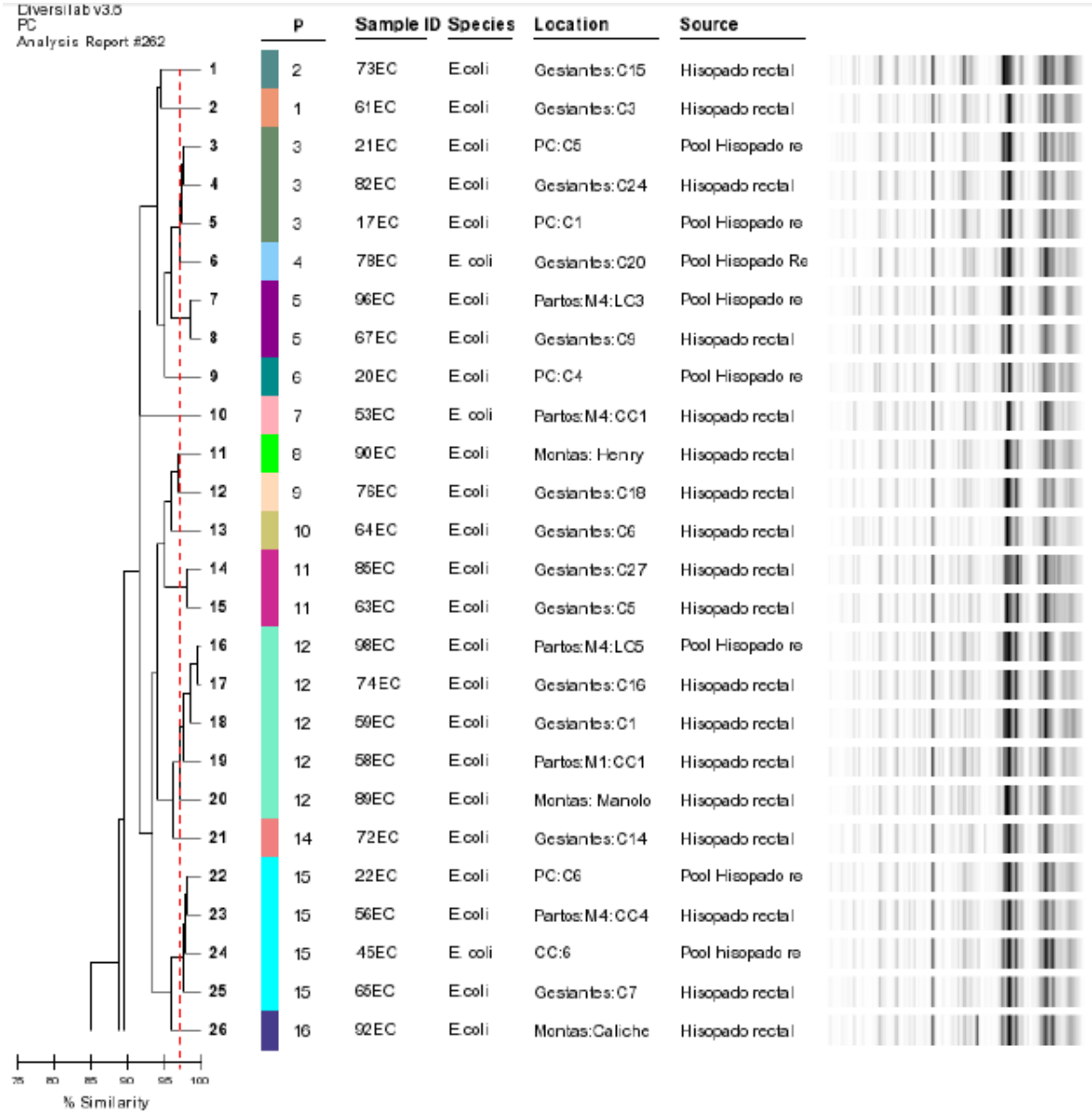
Relaciones genéticas (Dendogramas)

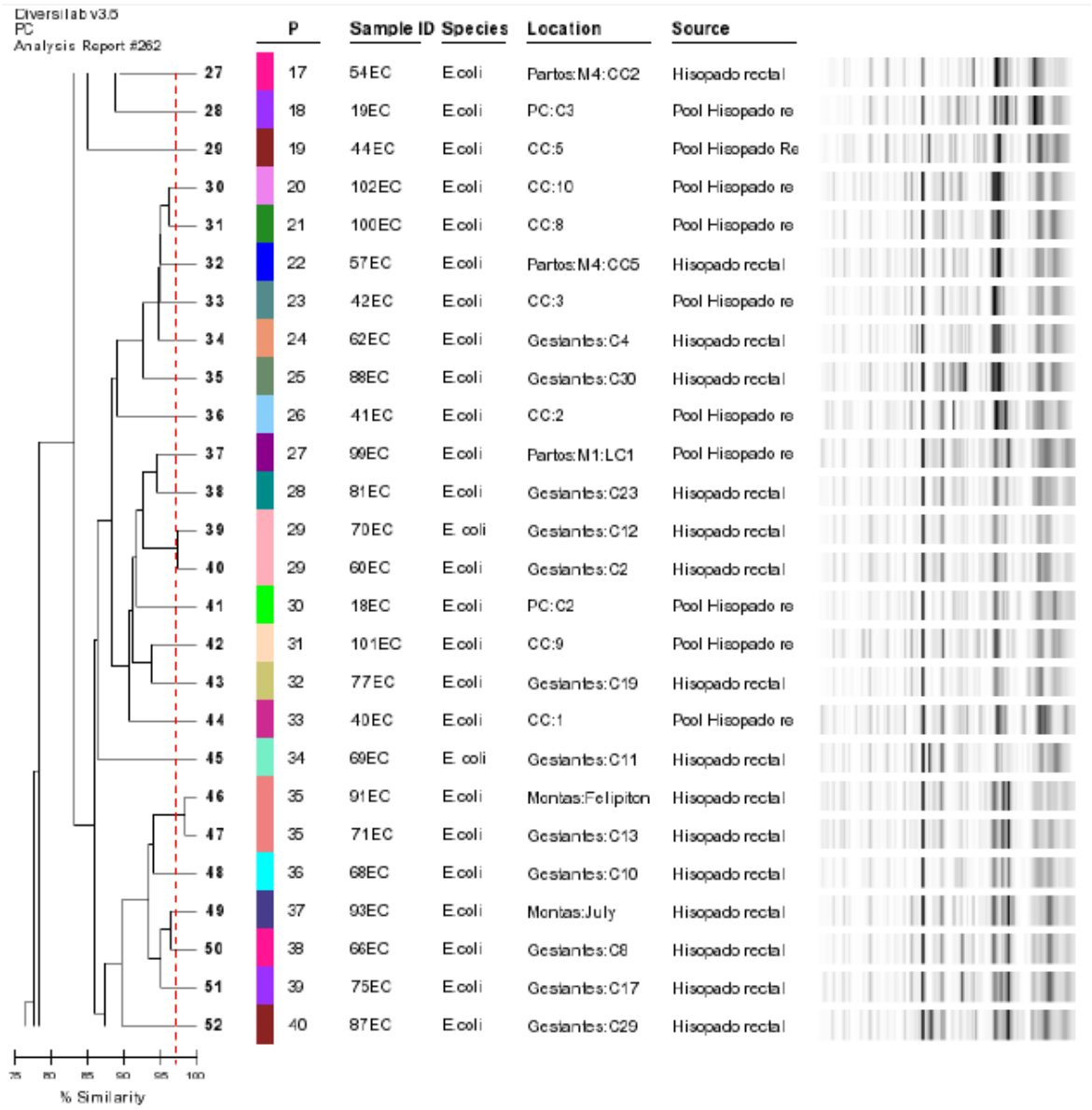
Se identificaron relaciones genéticas en cada especie bacteriana obtenida por medio de la técnica rep-PCR, usando como plantilla el DNA purificado, y análisis de los perfiles electroforéticos por el sistema Diversilab. El análisis se llevó a cabo por áreas, utilizando el algoritmo de Pearson-Correlation (PC), el cual tiene en cuenta la presencia o ausencia de bandas en el perfil electroforético e intensidad de las mismas, para clasificar el porcentaje de similitud entre los aislamientos analizados, aislamientos con >97% de similitud se categorizan como indistinguibles es decir hacen parte de un mismo grupo clonal, entre el 97-95% aislamientos similares posiblemente relacionados genéticamente y < 95% aislamientos no relacionados genéticamente.

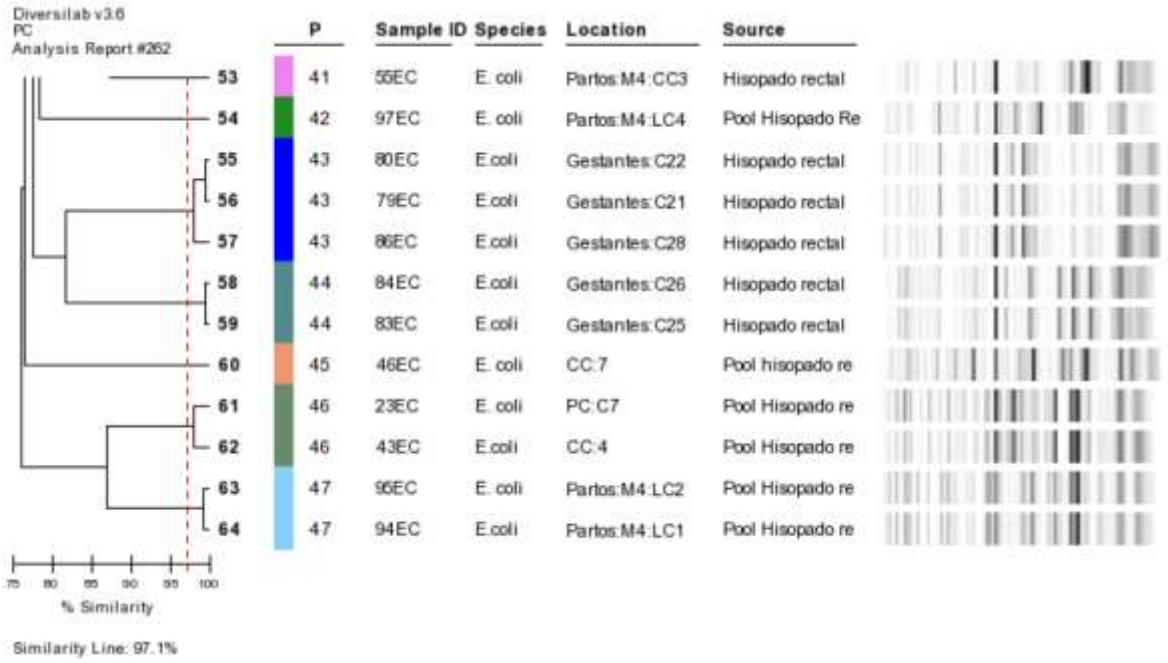
En el análisis entre las áreas (Figura 5) se identificaron 11 grupos clonales en total, 7 grupos clonales de 2 cepas, 2 de 3 cepas, 1 de 5 cepas y 1 de 4 cepas. Grupo clonal # 3 el cual tiene 3 cepas 2 de preceba y 1 de cerdas gestantes. Grupo clonal # 5 de 2 cepas 1 partos y otra gestantes. Grupo clonal #12 de 5 cepas 2 partos 2 gestantes y 1 montas. Grupo clonal # 15 de 4 cepas 1 pre ceba, 1 ceba, 1 partos y 1gestantes. Grupo clonal # 35 de 2 cepas 1 montas y 1 gestantes. Grupo clonal # 46 de 2 cepas 1 pre ceba y 1 ceba.

Los otros 5 grupos clonales # 43, 44 y 47 cada uno relacionan dos cepas de la misma área. De estos en el área de cerdas gestantes 4 grupos clonales, 3 grupos de 2 cepas el grupo clonal # 11 y # 29 donde las cepas se aislaron de corrales distantes y el # 44 donde las cepas se relacionan espacialmente corral 25 y 26. El otro grupo clonal # 43 conformado por 3 cepas, dos relacionadas espacialmente corral 21, 22 y la otra no corral 28. EL # 47 está compuesto por 2 cepas aisladas de dos corrales continuos. Ni en el área montas ni de ceba, se identificaron grupo clonales.

Figura 5: Dendograma de relaciones genéticas de cepas *E. coli* aisladas.




Diversilab v3.5
PC
Analysis Report #262
P
Sample ID
Species
Location
Source
27 17 54EC E.coli Partos:M4:CC2 Hisopado rectal
28 18 19EC E.coli PC:C3 Pool Hisopado re
29 19 44EC E.coli CC:5 Pool Hisopado Re
30 20 102EC E.coli CC:10 Pool Hisopado re
31 21 100EC E.coli CC:8 Pool Hisopado re
32 22 57EC E.coli Partos:M4:CC5 Hisopado rectal
33 23 42EC E.coli CC:3 Pool Hisopado re
34 24 62EC E.coli Gestantes:C4 Hisopado rectal
35 25 88EC E.coli Gestantes:C30 Hisopado rectal
36 26 41EC E.coli CC:2 Pool Hisopado re
37 27 99EC E.coli Partos:M1:LC1 Pool Hisopado re
38 28 81EC E.coli Gestantes:C23 Hisopado rectal
39 29 70EC E. coli Gestantes:C12 Hisopado rectal
40 29 60EC E.coli Gestantes:C2 Hisopado rectal
41 30 18EC E.coli PC:C2 Pool Hisopado re
42 31 101EC E.coli CC:9 Pool Hisopado re
43 32 77EC E.coli Gestantes:C19 Hisopado rectal
44 33 40EC E.coli CC:1 Pool Hisopado re
45 34 69EC E. coli Gestantes:C11 Hisopado rectal
46 35 91EC E.coli Montas:Felipitcn Hisopado rectal
47 35 71EC E.coli Gestantes:C13 Hisopado rectal
48 36 68EC E.coli Gestantes:C10 Hisopado rectal
49 37 93EC E.coli Montas:July Hisopado rectal
50 38 66EC E.coli Gestantes:C8 Hisopado rectal
51 39 75EC E.coli Gestantes:C17 Hisopado rectal
52 40 87EC E.coli Gestantes:C29 Hisopado rectal
% Similarity



Se observaron los patrones de crecimiento de las cepas de *E.coli* en donde cinco cepas presentaron resistencia a ácido nalidíxico (<13mm); de estas tres resistentes a ciprofloxacina (<20mm) y dos intermedias (21-30mm), que corresponden a bacterias que probablemente tienen una mutación en los genes *gyrA* y *parC*. Cuatro cepas con sensibilidad disminuida intermedia a ácido nalidíxico (14-18mm) e intermedio a ciprofloxacina (21-30mm) (Figura 6), perfil correspondiente a presencia de genes a nivel plasmídico como *qnr.* De notar que una cepa fue sensible a los dos antibióticos.

De las nueve cepas de *E. coli* seleccionadas con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina y/o levofloxacino, se amplificó el gen *qnrB*, en 7/9 obteniéndose una banda de 264pb (Figura 6) el peso esperado según el análisis bioinformático, las cepas positivas provienen de las áreas 1 de montas, 2 de gestantes, 1 de ceba y 3 de preceba. Cuando el equipo automatizado indicaba MIC superiores a 4ug/ml y la prueba de difusión en agar halos de 6mm no se encontró ningún gen codificado a nivel plasmídico de los evaluados, por tanto se considera que la resistencia es a nivel cromosomal por mutación de los genes *gyr A* y/o *parC.*

Figura 6: Resistencia a quinolonas.

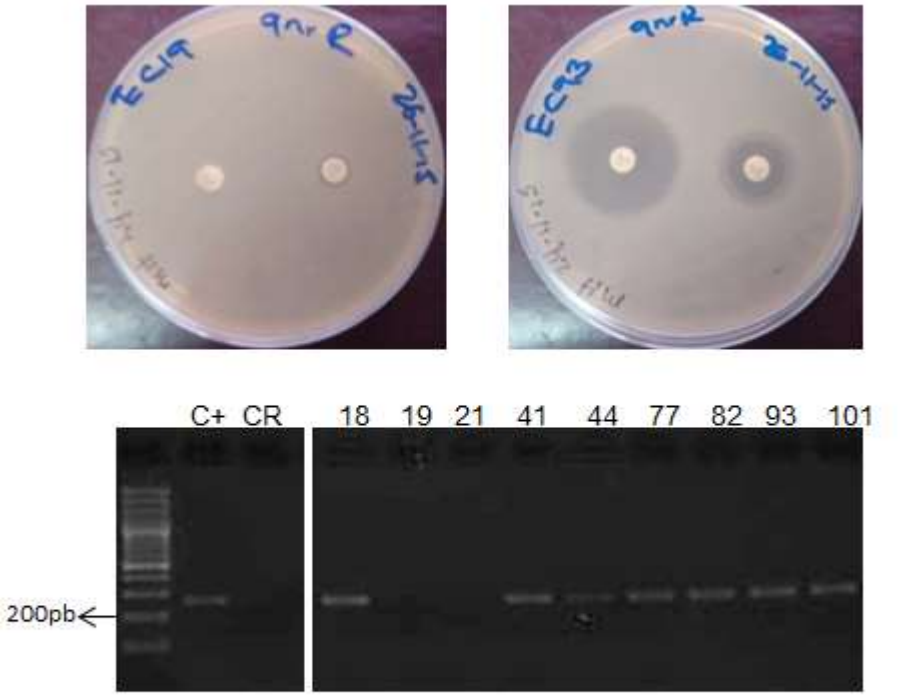


Figura 6: Resistencia a Quinolonas A. Prueba de difusión en agar, cepa de *E. coli EC*19 sugestiva de mutación a nivel cromosomal por su perfil de resistente a Ciprofloxacina (6mm) y ácido nalidixico (6mm). **B.** Prueba de difusión en agar, cepa de *E. coli* EC93 sugestiva de presencia de genes de resistencia a nivel plasmídico por sensibilidad disminuida a ácido nalídixíco (18mm) y Ciprofloxacina (28mm). **C.** Amplificación del gen *qnrB* (264pb) por PCR convencional.

Tabla 8: Perfil de resistencia quinolonas.

Cepa	Equipo automatizado Ciprofloxacina ug/ml	Difusión en agar		Mecanismo de Resistencia sugestivo	PCR Gen *qnrB*
		Ácido nalidíxico mm	Ciprofloxacina mm		
18	1	10	20	Cromosomal	Pos
19	>=4	6	6	Cromosomal	Neg
21	>=4	6	6	Cromosomal	Neg
41	1	12	26	Cromosomal	Pos
44	<=0,5	16	26	Plasmídico	Pos
77	1	10	26	Cromosomal	Pos
82	1	16	26	Plasmídico	Pos
93	1	18	28	Plasmídico	Pos
101	1	26	40	plasmídico	Pos

De los genes *qnrD, oqxA, oqxB* y *aac(6')-Ib* ninguno se amplificó en las cepas seleccionadas. De los genes *qnrA, qnrC, qnrS, qepA* no se contaba con control positivo; sin embargo, se procesaron pero ninguna muestra amplificó. Esos genes son poco encontrados.

Resistencia a β-lactámicos

De las 9 cepas de *E. coli* procesadas, ninguna presentó un perfil de resistencia sugestivo de presencia de β-lactamasas de espectro extendido BLEES; tres cepas presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación ceftazidima (16mm) y cefotazime (16mm) e igualmente resistentes a estos antibióticos con el inhibidor ácido clavulánico (16mm), las otras 6 cepas dieron sensibles a ceftazidima (>21mm) y cefotazime (>26mm) y a estos con los inhibidores.

En el perfil fenotípico para evaluar la presencia de β-lactamasas tipo ampC, se observó de las nueve cepas evaluadas, sinergia de disco entre el ácido borónico y ceftazidima (Figura 7) en 3 cepas del área de partos, siendo sugestivo de presencia de una β-lactamasa tipo ampC; adicionalmente se observó resistencia a cefoxitina.

De las cepas resistentes a cefalotina, cefalosporina de primera generación, a las cuales se le amplificaron los genes bla_{TEM}, bla_{SHV} y bla_{OXA}, se visualizó una banda de 800pb (Figura 7) correspondientes al peso esperado para el gen bla_{TEM} en 13/39 de las cepas de *E. coli*, correspondientes a 2 del área de cerdas gestantes, 6 de pre ceba y 5 de ceba. El gen bla_{SHV} y bla_{OXA} no se encontró en las cepas evaluadas.

De las 9 cepas resistentes a cefelosporinas de segunda (cefoxicitina y cefuroxima), tercera generación (ceftazidima y ceftriazona) y/o con resistencia a inhibidores de betalactamasas (amoxicilina-clavulanato, piperacilina – tazobactam y Ampicilina-Sulbactam) no se encontraron los genes bla_{CTXM}, bla_{ACC}, bla_{FOX}, bla_{MOX}, bla_{DHA}, bla_{MIR}, bla_{GES}, bla_{VEB} y bla_{PER}. Se evidenció en tres cepas del área de partos una banda de 538pb (Figura 8) correspondiente a los primers MultiCaseCIT, el cual puede amplificar los genes bla_{LAT-1} a bla_{LAT-3}, bla_{BIL-1}, bla_{CMY-2} a bla_{CMY-7}, bla_{CMY-12} a bla_{CMY-18} y bla_{CMY-21} a bla_{CMY-23}, que codifican para betalactamasas tipo ampC.

Figura 7: Resistencia a β-lactámicos.

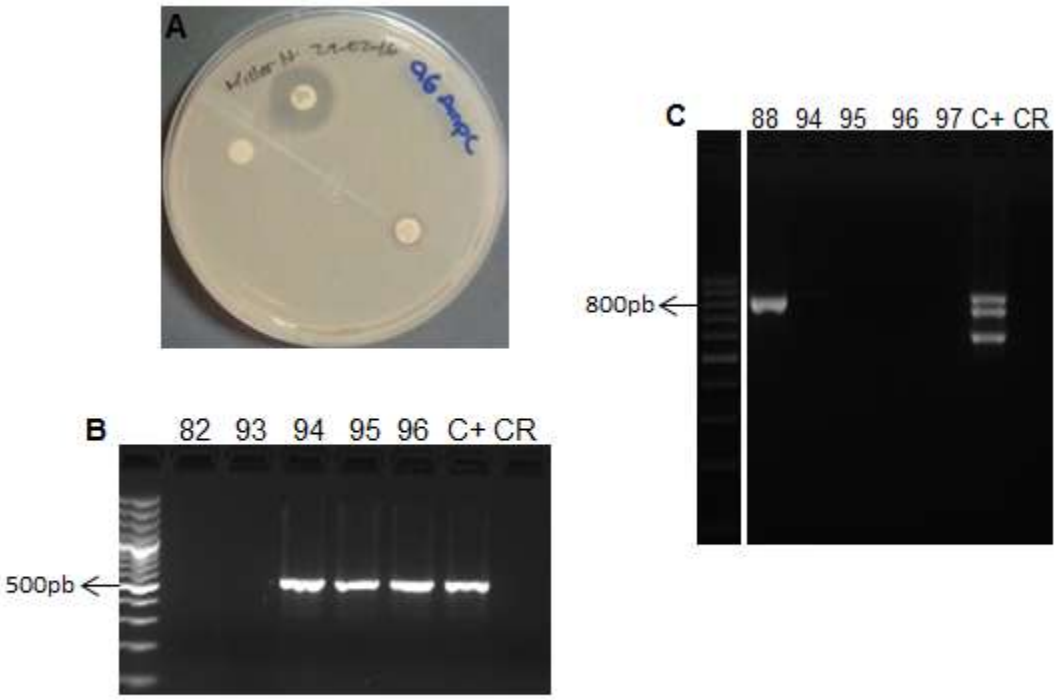


Figura 7: Resistencia a β–lactámicos A. Prueba de difusión en agar, cepa de *E. coli* EC96 sugestiva de presencia de β-lactamasa tipo ampC, hay sinergia de sensidiscos de ácido borónico y ceftazidima, resistencia a cefoxitina. **B.** Amplificación del gen que codifica para la β– lactamasa ampC (538pb) por PCR convencional **C.** Amplificación de los genes que codifican para β–lactamas TEM (800pb), SHV (713) y OXA (564) por PCR convencional.

Resistencia a Colistina

Se evidenció la amplificación de una banda de 309 pb (Figura 8) correspondiente al gen *MCR-1* en 50/53 de las cepas de *E. coli* evaluadas, discriminados (Tabla 9) por área de montas el 5/5, cerdas gestante 23/24, partos 8/9, pre ceba 5/5 y ceba en 9/10.

Figura 8: Amplificación gen *mcr-1***.**

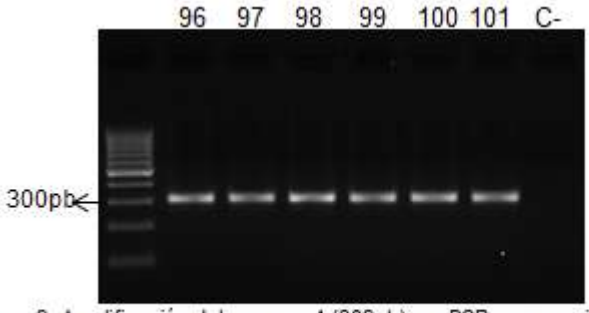


Figura 9: Amplificación del gen mcr-1 (309pb) por PCR convencional con la metodología propuesta por Liu *et al*. Mezcla de reacción: Buffer 1X, ClMg1,5mM, dNTPS 0.3mM, C/primer F y R 1uM Taq Platinum0.02U/ul, DNA200ng

Grupos de incompatibilidad de plásmidos

De las nueve cepas seleccionadas para evaluar los grupos de incompatibilidad de plásmidos se encontró (Figura 9)una de banda de 471 pb correspondiente a IncHI1 en 11,1% (1/9), una de 139 pb correspondiente a IncI1 en 55,5% 5/9, una banda de 559 pb correspondiente a IncN en 44,4% (4/9), una banda de 702 pb correspondiente a IncFIB en 44,4% (4/9), una banda de 462 pb correspondiente a IncFIA en 11,1% (1/9), una banda de 534 pb correspondiente a IncP en 11,1% (1/9), una banda de 765pb correspondiente a IncY en 11,1% (1/9), una banda de 465 pb correspondiente a IncA/C en 22,2% 2/9, una banda de 270 pb correspondiente a IncF en 44,4% 4/9. No se encontraron los grupos IncHI2, IncX, IncL/M, IncW, IncFIC, IncT, IncFIIAs, IncK y IncB/O.

Figura 9 : Grupos de incompatibilidad de plásmidos identificados.

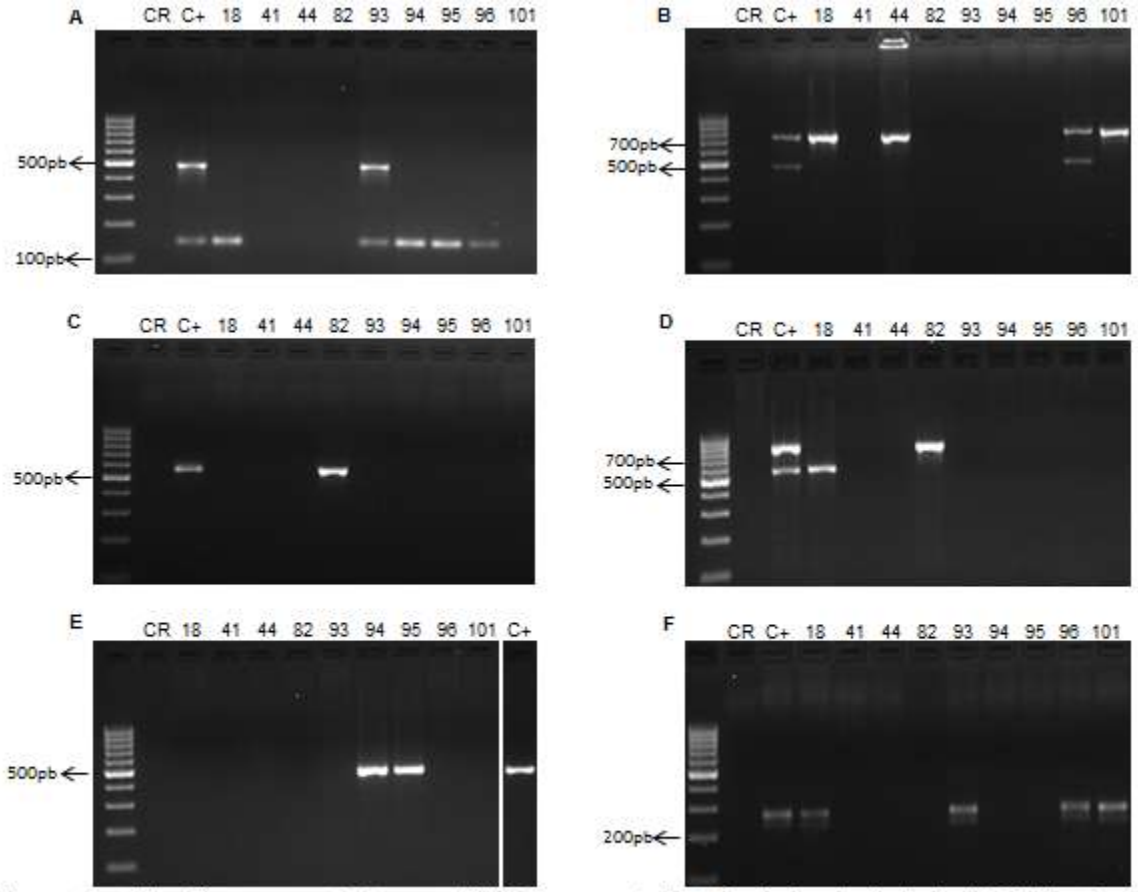


Figura: Amplificación grupos de incompatibilidad por metodología de Carattoli *et al.*, (2005).Mezcla de reacción Buffer 1X, ClMg1,5mM, dNTPS 200uM C/primer F y R 1uM Taq Platinum 1uM, DNA200ng. **A.** Grupos HI1(471pb), I1(139pb) y HI2 (644pb). **B.** FIA(462pb), FIB(702pb) y W(242pb). **C.** X(376pb), N(559pb) y L/M(785pb). **D.** Grupos Y(765pb), P(534pb) y FIC(262pb). **E.** A/C (465pb), T (750pb) y FIIAs(270pb). **F.** Grupo F(270pb) .

De las cepas de *E. coli* evaluadas, una del área de montas presentó los grupos de incompatibilidad IncH1I, IncI1 y IncF, una del área de cerdas gestantes IncN y IncY, dos del área de partos con los grupos IncI1, IncN y IncA/C y otra con IncI1, IncN, IncFIB, IncFIA y IncA/C. Del área de preceba una cepa presenta los grupos I1, FIB, P y F, del área de ceba una cepa amplificó para IncFIB, otra para IncFIB y IncF y otra dio negativa a todos los grupos de incompatibilidad evaluados.

Integrones *int123, sul 1, sul 2,* qacΔ

En la PCR correspondiente para cada gen se observó un producto de 491 pb para la integrasa en el 17,2% (11/64), de 789 pb para *sul1* 7,8% (5/64), de 722 pb para *sul2* 20,3% (13/64) y de 277 pb para *qacΔ* 7,8% (5/64). En ninguna cepa de *E.coli* se encontró los 4 genes, en una cepa de pre ceba se encontró *int123*, *sul1* y *qacΔ*, dos cepas del área de partos, tres del área de gestantes, una de montas presentan *int123* y *sul2*, cuatro cepas sólo amplificaron para integrasas 1, 2, 3, una cepa del área de partos amplificó para *sul1, sul2* y *qacΔ*, dos cepas de área de gestantes y una de montas amplificaron para *sul1* y *qacΔ* y seis cepas sólo amplificaron para *sul2*.

Tabla 9: Número de cepas con genes *int123, sul1, sul2* y *qacΔ*.

	Integrones				Colistina	Betalactamasas		Grupos de incompatibilidad								
Área de la granja	*int123* n=64	*sul1* n=64	*sul2* n=64	*qacΔ* n=64	*MCR-1* n=53	*ampC* n=9	*TEM* n=39	HI1 n=9	I1 n=9	N n=9	FIB n=9	FIA n=9	IncY n=9	IncP n=9	A/C n=9	F n=9
Montas	1	1	1	1	5	0	0	1	1							1
Cerdas gestantes	6	2	5	2	23	0	2			1			1			
Partos	2	1	5	1	8	3	0		3	0	1	1			2	1
Pre Ceba	1	1	2	1	5	0	6		1		1			1		1
Ceba	1	0	0	0	9	0	5				2					1
Total	11	5	13	5	50	3	13	1	5	1	4	1	1	1	2	4

DNA plasmídico

Se evidenciaron bandas de distintos tamaños para las nueve cepas analizadas. Se obtuvo el DNA de la cepa V517, como control de extracción.

Secuenciación

Con la secuenciación de la cepa *E. coli* EC96 se identificó como ST 642, longitud del genoma de $5*10^6$pb. En esta se encontraron 61 genes asociadas con resistencia antibiótica y 140 con factores de virulencia. Dentro de los genes de resistencia de interés se encontraba el gen *mcr-1 (Anexo 4), qnrB19, bla* $_{CMY-2}$. También se identificaron los grupos de incompatibilidad plasmídico IncFII, IncI1, IncN, IncFIA, IncFIB, IncX4, Col156 y ColRNAI.

Tabla 10: Genes de la cepa *E. coli* EC96.

RESISTENCIA	
Genes de resistencia	Resistencia a
mcr-1,	Colistina
qnrB19	Quinolonas
cmy-2,	Betalactámicos
Bombas de expulsión familia MATE	Quinolonas
VIRULENCIA	
celb	Endonucleasa colicina E2
gad	Glutamato descarboxilasa
exhA	Enterohemolisina
iss	Aumento de supervive cia
mchF	Proteína transportadora
lpfA	Fimbrias polares

Capítulo 4

Discusión

En este estudio se valoró la presencia de resistencia a antibióticos, usando como unidad de análisis una granja porcícola. Se estableció la presencia de resistencia a antibióticos en varias de las cepas aisladas y parte de esta se puede explicar por el uso de estos fármacos.

Si bien fue posible recuperar de *S. aureus,* ésta se considera baja (2,07% (5/241)), y podría deberse a que los animales de estudio se encuentran en contacto con restos de materia fecal donde la población de Enterobacterias compite con la flora presente en la zona nasal lo cual dificulta el aislamiento de *este* microorganismo. Por el contrario *E. coli* fue aislada en el 100% de las muestras tomadas, esto gracias a que es flora normal y de alta.

Resistencia a β-lactámicos

Los β-lactámicos son un grupo de antibióticos que actúan inhibiendo la última etapa del proceso de síntesis de pared celular bacteriana (Marin & Francesc, 2003). Dentro de este grupo se encuentran penicilinas, penicilinas resistentes a penicilinasa, derivados de la penicilina de amplio espectro, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos y estos mezclados con inhibidores de β–lactamasas como el ácido clavulánico. Todos tienen estructura química y mecanismo de acción común, pero se puede clasificar en clases distintas con diferentes espectros de actividad antimicrobiana y cualidades únicas (Stanley *et al*., 2004). La estructura básica de los β-lactámicos incluye la presencia del anillo β-lactam (2-azetidinona). En el caso de las penicilinas, el anillo β-lactam está unida a un anillo de tiazonilidina y para cefalosporinas a un anillo dihidrotiacínico, lo que confiere diferencia estructural y de espectro de acción (Lara *et al*., 2012).

La actividad bactericida de los antibióticos β-lactámicos, resulta de interferir la última etapa de la biosíntesis del peptidoglicano, el cual está constituido por N-

acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Los componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados al espacio entre la membrana citoplasmática y la pared celular. Aquí las PBP (*penicillin binding protein*), enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas, son las encargadas de formar tetrapéptidos a partir de pentapéptidos. Los anillos de los β-lactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina), y eso permite su unión al lugar activo de la transpeptidasa (Asbel &Levison *et al.,* 2000; Ghamrawi et al., 2015).

Están reportados cuatro mecanismos básicos de resistencia microbiana a cefalosporinas que incluyen mutaciones en PBP, disminuyendo su afinidad por el sitio blanco; cambios en la pared celular, específicamente pérdida de porinas, evitando que el antibiótico llegué a las PBP; bombas de eflujo que aunque el antibiótico ingresa el microorganismo, lo expulsa; y la última de gran importancia producción de β-lactamasas que inactivan el fármaco, ya que están altamente relacionadas con transferencia horizontal de genes (Bush & Jacoby., 2010).

En la granja de estudio la resistencia a β-lactámicos más alta evidenciada fue a ampicilina 20/64 y cefalotina 38/64. Changsun *et al*., (2011), reportaron resistencia superior a 87% (249/285) a ampicilina en cepas de *E. coli* aisladas de animales. Las cepas que presentan esta característica son policlonales y el principal mecanismo de resistencia a este grupo de antibióticos son las β-lactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo β-lactámico antes que el antibiótico se una a las PBP.

Las β-lactamasas pueden ser clasificadas por características moleculares (A, B, C y D), de acuerdo a la secuencia de aminoácidos o funcionalmente (grupos 1, 2 y 3 con subgrupos), de acuerdo al perfil del sustrato e inhibidores (Bush, 2013), y pueden estar asociadas a elementos genéticos móviles. Por tanto, en nuestro trabajo se evaluó la presencia de los genes que codifican para las enzimas TEM, SHV y OXA que se encuentran a nivel plasmídico, encontrándose el gen bla_{tem} en 13/39 de las cepas de *E. coli*.

Las TEM son serín β-lactamasas del grupo 2b de acuerdo a la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros o A de acuerdo a la de Ambler. Estas enzimas hidrolizan el anillo β–lactámico por un sitio activo de serina y su espectro abarca penicilinas y cefalosporinas de primera generación como cefalotina, y son fuertemente inhibidas por el ácido

clavulánico y tazobactam. Escudero *et al*., 2010 aislaron 29 cepas *E. coli* de cerdo de las cuales 21 fueron positivas para la prueba confirmatoria de BLEES. En 11 detectaron el gen que codifica para la enzima TEM 1-b, no encontraron β-lactamasas tipo OXA, pero si SHV en 12 y CTXM en 9 aislados. En nuestro estudio ninguna cepa era productora de BLEES; sin embargo, se realizó a 9 cepas prueba confirmatoria y todas dieron negativo.

Adicionalmente 3/12 cepas aisladas de *pool* de hisopado rectal de lechones del área de partos presentan resistencia a la mayoría de β-lactámicos evaluados, como cefalosporinas de segunda (cefoxitina, cefuroxima) y tercera generación (ceftazidima, ceftriaxona), inhibidores de BLEEs (amoxacilina clavulanato) y monobactámicos (aztreonam). Este perfil de resistencia no se observó en otras cepas de la granja y por tanto se sugiere la presencia de un mecanismo de resistencia distinto al de los otros aislamientos, como β-lactamasas tipo ampC o IRT, por su resistencia a inhibidores de BLEEs.

Por prueba fenotípica de sinergia de disco se sugiere que estás tres cepas presentan β-lactamasas tipo ampC y por PCR convencional se detecta la presencia del gen que codifica para una β–lactamasa tipo ampC plasmídica, las cuales son cefalosporinasas del grupo 1 de acuerdo a la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros o C de acuerdo a la de Ambler (Bush & Jacoby, 2010). Estas están clasificadas en 5 familias de acuerdo a su relación con ampC cromosómica del microorganismo que fueron derivadas, *Aeromonas spp* (enzimas relacionadas con CMY-1, familias MOX Y FOX), *Citrobacter freundii* (relacionadas con CMY2, LAT-1 y CFE-1), *Enterobacter spp.* (familias MIR y ACT), *Hafnia alvei* (familia ACC) y *Morganella morganii* (familia DHA) (Bush, 2013).

Los *primers* utilizados en nuestro trabajo pueden amplificar tres tipos de estas enzimas LAT, BIL ó CMY (LAT-1, LAT-2, LAT-3, BIL-1, CMY-2 a CMY-7, CMY-12 a CMY-18, CMY-21, CMY-22 y CMY-23), y por secuenciación se confirma que la cepa de *E. coli* EC96 tiene el gen bla_{CMY-2}, el cual codifica para la β–lactamasa tipo ampC CMY-2. Rayamajhi *et a*l., 2008 en 130 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de necropsia de cerdos no encontraron CMY pero si encuentran DHA-1, SHV y TEM. Escudero *et al*., 2010 no reporta haber encontrado este gen. Salviati *et al.,* 2015 tampoco lo reporta en *pool* de heces, pero si en el ambiente.

Propuesta de mecanismo de resistencia a β-lactámicos en la granja

Según información suministrada por personal de la granja en estudio, se administra ceftiofur a lechones recién nacidos, como medida de profilaxis. Este medicamento es una cefalosporina de tercera generación, cuyo uso principal es el tratamiento de enfermedades respiratorias en cerdos y ganado (Beyer *et al.*, 2015). Sus principales metabolitos identificados en orina son el DFC-dímero (27,1%) y DFC-cisteína (32,3%), aparte de ceftiofur sin alteración (28,3%) (Beconi-Barker *et al.*, 1995), las cuales conservan su anillo de β-lactámico activo.

En el área de partos donde se encuentran los animales a los cuales se les suministra ceftiofur, también se identificó resistencia a la cefalosporina de primera generación cefalotina (10/12), donde 6 muestras son de lechones con 18 días de edad que se les administra el antibiótico, y de los cuales 5/6 son resistentes. La muestra sensible es de los que tienen 3 días de nacidos, quienes ya están recibiendo el antibiótico. También se identificaron 3/6 *E. coli* aisladas de lechones de 18 días con resistencia a cefalosporinas de segunda generación (cefoxitina y cefuroxima), y tercera generación (ceftazidima y ceftriaxona), en recién nacidos que recibieron ceftiofur, que podrían inducir co-selección para otras cefalosporinas por la similitud en su estructura química.

Beyer *et al*., 2015, en dos grupos de estudio uno al cual le suministran ceftiofur y otro al que no, evidencian que tras un esquema de tratamiento completo no detectan resistencia. En nuestro estudio lechones de tres días, no presentan resistencia a cefalosporinas de tercera generación, pero lechones de 18 días si tienen resistencia. Esta última observación podría atribuirse a la cantidad y tiempo de administración del antibiótico que para la granja en estudio es por debajo de lo recomendado. Este dato es interesante porque estos esquemas irregulares de dosificación estarían favoreciendo la adquisición de resistencia. Sin embargo, como se ha descrito que aún dosis correctas, en cursos repetidos aumentan niveles de resistencia (Beyer *et al*., 2015), esto podría también explicar las resistencias encontradas en nuestro trabajo.

Resistencia a cefalotina fue documentada en todas las áreas de la finca, que podría explicarse por el proceso de producción de la finca y estar asociada a metabolitos

de ceftiofur, eliminados por lechones en orina. Por tanto, un metabolito de un antibiótico aprobado para uso en animales podría co-seleccionar resistencia a cefalosporinas de primera generación como cefalotina, que son de uso en medicina humana, ya que su estructura es similar. Adicional a esto, dado que está en el ambiente, los otros animales que compartan el mismo espacio podrían estar expuestos a estas dosis de antibiótico, lo que explicaría la resistencia a cefalotina en el área de partos (5/6). Beyer *et al*., 2015, encontraron que después de varios días, los animales a los que no les suministraron ceftiofur, pero que compartían el mismo espacio, también presentaban resistencia a este antibiótico.

Resistencia a Polimixinas

Los resultados de nuestro estudio indican que hay resistencia a colistina, una polimixina, un grupo de antibióticos polipeptídicos catiónicos descubiertos en 1940. Son pentapéptidos cíclicos unidos covalentemente a una cadena de ácido graso. Se derivan de *Paenibacillus* (*Bacillus*) *polymyxa*. Existen 5 tipos (polimixinas A a la E), dos de estos descritos para uso en humanos. Polimixina B difiriere estructuralmente de polimixina E (colistina) por el cambio de un aminoácido (D-fenilalanina en lugar de D-leucina) (Landman *et al*., 2008).

El espectro de actividad bactericida de colistina es amplio sobre todo a bacterias Gram negativas. El mecanismo de acción es mediado por su unión a lipopolisacárido y fosfolípidos de la membrana externa por una interacción hidrófoba entre el ácido graso de nueve carbonos de la cadena de colistina y la porción de ácidos grasos del lípido A. Se desplazan competitivamente cationes divalentes a partir de los grupos fosfato de los lípidos de membrana, lo que lleva a la interrupción de la membrana celular externa, filtración de los contenidos intracelulares y muerte bacteriana (Catrya *et al*., 2015).

La resistencia a nivel cromosomal hacia colistina esta mediada por los genes de resistencia a polimixina (*pmr*), que promueven la modificación covalente del lipopolisacárido reduciendo las cargas negativas disponibles para su interacción con las polimixinas, cargadas positivamente. La modificación de lípido A se produce tras la unión de fosfoetanolamina (PEtN) y 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N), evitando la unión de polimixina a la superficie de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Los

genes *pmrB* y *pmrA* codifican para un sistema de dos componentes con un sensor histidin quinasa (*pmrB*) y su regulador (*pmrA*), el cuál una vez fosforilado (modificación el lípido A), activa la expresión de los genes *pmr* y disminuyendo su afinidad por lla polimixina. En *Yersinia*, otros mecanismos de resistencia implican bombas de salida compuestos de RosA y RosB, y en *Klebsiella spp*., moléculas como polisacáridos presentes en la cápsula juegan un papel clave en la protección contra polimixina y otros péptidos antimicrobianos (Kempfa *et al*., 2013; Olaitan *et al.,* 2014; Quesada *et al*., 2014).

Hasta 2015 sólo se conocían la resistencia a polimixinas a nivel cromosomal arriba descritas. Sin embargo, Yi-Yun Liu *et al*., 2016, identificaron los primeros aislamientos de *E. coli* con genes de resistencia a polimixina E (colistina) codificados a nivel plasmídico. MCR-1 es la proteína encargada de esta resistencia, miembro de la familia de enzimas fosfoetanolamino transferasas, que adicionan fosfoetanolamina al lípido A impidiendo la unión de la polimixina. Arcilla *et al.*, 2016 identificaron dos aislamientos resistentes a colistina en *E. coli* recuperada de un cerdo y un humano indistinguibles genéticamente por electroforesis en campo pulsado, sugiriendo la transmisión de animal a humano de la misma cepa; en esta identificaron el gen *mcr-1* reportado por Yi-Yun Liu y colaboradores.

En Colombia a la fecha no hay datos de la presencia de este gen. En nuestro estudio de 53/64 cepas *E. coli* resistentes a colistina, en 50/53 recuperadas de animales se identificó el gen *mcr-1* en *E. coli* y se confirmó por secuenciación, siendo éste el primer reporte para el país. En Latinoamérica, un estudio multicéntrico de vigilancia de resistencia antimicrobiana realizado en Brasil donde evaluaron la resistencia a colistina en 4620 muestras de Enterobacterias, recolectadas entre 2000 y 2016 y recuperadas de diferentes fuentes (humanos, animales, alimentos y ambiente), identificaron el gen *mcr-1*, y la aparición de este gen desde 2012 (Fernandes, 2016). En España Quesada *et al*., 2016 detectaron este mismo gen a nivel plasmídico en muestras de animales de granjas aisladas.

En nuestro estudio se encontró la presencia de integrones pero sólo en 10 cepas de las positivas para gen *mcr-1* y en 9 cepas se encontraron los grupos de incompatibilidad plasmídico IncI1, IncHI1, IncN, IncFIA, IncFIB, IncP, IncY y IncF, lo que se relaciona con lo reportado en la literatura donde éste gen ha sido identificado en distintos grupos de incompatibilidad plasmídico como por ejemplo IncHI2, IncX4, IncP,

Inc FII y IncFIB (Haenni *et al*., 2016; Falgenhauer *et al*., 2016; Patersonor *et al*. 2016; Yi-Yun Liu *et al.,* 2016). Por tanto, se considera que este gen pueda estar asociado a un elemento móvil como una secuencia de inserción o tranposones, dándose la transferencia horizontal de genes mediada por diferentes vías (Haenni *et al.,* 2016; Falgenhauer *et al*., 2016).

En medicina humana las polimixinas estaban restringidas a uso oftálmico y tópico por su nefrotoxicidad y neurotoxicidad, sin embargo, con la aparición de cepas multiresistentes, se han utilizado a nivel sistémico como última opción terapéutica contra estas bacterias. En contraste, en medicina veterinaria ha sido usada por décadas (Catry *et al*., 2015), como tratamiento y prevención de enfermedad diarreica causada por *E. coli* y *Salmonella spp*. en porcinos (Timmerman *et al*., 2006).

El gen *mcr-1* podría haber llegado a la granja a través de los machos del área de montas que vienen de otras granjas y de ahí diseminarse al resto de las áreas por transferencia horizontal de genes. No obstante, en la granja en estudio no se reportó el uso de polimixinas, que realice presión selectiva para estos niveles de resistencia. Se postula que la selección se da por co-selección de otros antibióticos usados en la granja (β-lactámicos, quinolonas o sulfamidas). Para poder dilucidar esto, se debe analizar toda la cadena pre y postproducción de la granja, e incluyendo análisis de muestras de del ambiente por fuera de los corrales.

Resistencia a Fluoroquinolonas

Las quinolonas son agentes antimicrobianas de amplio espectro, eficaces para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su estructura química básica está formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición4 La ciprofloxacina además tiene un grupo piperacínico en la posición 7 lo que potencia su actividad. Así, dependiendo del grupo funcional, su espectro de acción cambia y clasifica a las quinolonas, inicialmente en tres generaciones (Naber, 1998). Sin embargo, su clasificación se actualizado a aquellas de primera generación (ácido nalidíxico y cinoxacina), segunda generación (norfloxacina, ciprofloxacina), tercera generación

(levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina) y cuarta generación (trovafloxacina) (King *et al.*, 2000).

Las fluoroquinolonas actúan sobre la DNA girasa y/o la topoisomerasa IV, siendo la primera enzima el blanco de acción en Gram negativos y la segunda en Gram positivos (Alo´s, 2009, Drilca y Zhao, 1997). La función de estas enzimas se asocia con el superenrollamiento y desenrrollamiento del DNA.

Se han identificado genes en elementos genéticos móviles que codifican para diferentes mecanismos de resistencia, y se conocen como genes de resistencia a quinolonas mediados en plásmidos (PMQR), que codifican las proteínas Qnr que se unen a la topoisomerasa evitando la acción del antibiótico. Los genes se han clasificado en *qnrA, qnrB, qnrS, qnrC y qnrD* junto con PMQR, *aac(6')-Ib-cr* variante de una acetiltransferasa con capacidad para degradar ciertas quinolonas, *oqxAB* y *qepA* que codifican para sistemas de eflujo que expulsarían fluoroquinolonas. La resistencia generada por estos genes codificados a nivel plasmídico genera aumento modesto de la CMI de fluoroquinolonas (Redgrave, 2014). La resistencia a estos agentes es multifactorial, y puede ser por mutaciones en el sitio de acción del antibiótico (*gyrA* y/o *parC*), sobreexpresión de bombas de eflujo, o cambios en la permeabilidad.

Estos antibióticos son ampliamente utilizados en humanos, para tratamiento de infecciones de vías urinarias y respiratorias. También son utilizados en animales como profilaxis y tratamiento, para los cuales hay unos de uso exclusivo veterinario ejemplo enrofloxacina y marbofloxacina (Sturini *et al.*, 2012), con el fin de que su uso en animales no genere impacto en medicina humana. En nuestro estudio se identificaron 9/64 aislamientos resistentes a quinolonas, de las cuales por CMI, dos son sugestivas de resistencia cromosomal y 7 de plasmídicas. Por medio de PCR se identificó el gen *qnrB*, en 7 de las 9 muestras analizadas. Se presume que las dos muestras negativas concordantes con CMI ≥4, presentan mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC,* para poder confirmar esta información se debe secuenciar las cepas.

En Colombia Karczmarczyk *et al* 2010 identifican el gen qnrB19 en el 30,8% (4/13) de cepas de *Salmonella sp.* aisladas de productos para consumo, tampoco

identifican los genes *aac(60)-Ib-cr, qepA, qnrA ni qnrS* y Cattoir et al., 2008, lo identifica en *E. coli* aislada de un paciente.

Chen *et al*., (2012) identifican en 16 cepas de *E. coli* aisladas de la flora comensal de cerdos los genes *qnrB* en 2cepas, *qnrS* en 3, *aac(6=)-Ib-cr* en 7 y *oqxAB* en 3. En nuestro estudio identificamos mayor número de cepas con el gen *qnrB,* pero no identificamos los genes *qnrS, aac(6=)-Ib-cr* y *oqxAB.* En otro estudio realizado por Fortini *et al*., (2011) en cepas de *E. coli* aisladas de pollos y cerdos sanos de Nigeria encuentran mayor número de aislamiento de *qnrB* similar al nuestro, *qnrB19* en 3 cepas, *qnrB10* en 1cepa y concomitante *qepA1* y *qnrB10* en 1cepa. Sin embargo al igual que en el estudio de Chen et al., identifican otros genes plasmídicos no encontrados por nosotros *qnrS1* en 12 y *qepA1* en 3.

Las dos muestras negativas para el gen *qnrB* con CMI ≥4, podrían presentar mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC,*. Estas cepas no son clonales de acuerdo a los análisis del diversilab, pero son del área de pre ceba, donde se da a los lechones ciprofloxacina en agua apenas los separan de su madre como medida profiláctica, lo cual genera presión antibiótica constante en esta área, lo que pudo llevar a estas bacterias a mutar los genes relacionados, para sobrevivir a la presión antibiótica aunque este mecanismo genera un costo energético muy alto.

Más aún, se detectó resistencia codificada a nivel plasmídico el gen *qnrB* en áreas donde no se reportó uso profiláctico. Sin embargo en estas áreas cerdas gestantes, montas y ceba se pudo utilizar otra quionolona sintética enrofloxacina[12] (segunda generación) la cual alcanza altas concentraciones séricas, tisulares e intracelulares (Alo´ s, 2009). Este es metabolizado en hígado y eliminado por orina y heces, en la orina han encontrado como sus metabolitos en un 17% enrofloxacina y 31% de ciprofloxacina como su principal metabolito (EMEA. 1998). Datos publicados por Zhao et al., (2010) demuestran la presencia de fluoroquinolas en heces de cerdos en granjas donde estos son usados ciprofloxacina en 24.6% y enrofloxacina en 49.2% de ocurrencia. El uso de este antibiótico o sus metabolitos pueden contribuir a mantener este gen de resistencia; en el área de partos donde están los lechones recién nacidos los donde se usa β-lactámicos como profilácticos no se presentó resistencia a quinolonas.

[12] Forma comercial Enrover

Resistencia a Trimetroprim sulfametoxazol

El sulfametoxazol ([4-amino-N- (5-metil-3-isoxazolil) -bencenosulfonamida]) hace parte del grupo de las sulfonamidas las cuales son análogas del ácido paraaminobenzoico, con el cual compiten por su unión a la enzima dihidropteroatosintetasa (DHPS), interrumpiendo la formación del ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. Por otra parte las diaminopirimidinas, como el trimetroprin ([5-(3,4,5-trimetoxibencil) pirimidina-2,4-diildiamina]) compite por la enzima dihidrofolatoreductasa que cataliza la conversión de ácido dihidrofólico en ácido tetrahidrofólico, la forma fisiológicamente activa del ácido fólico y un cofactor necesario en la síntesis de timidina y purinas (Masters *et al*., 2003). Estos dos antibióticos son utilizados combinados en un solo producto farmacéutico, bloqueando 2 enzimas de la misma vía metabólica de la biosíntesis del ácido fólico, evitando finalmente la formación del DNA bacteriano. Se precriben para el tratamiento de infecciones como bronquitis, otitis media, infección del tracto urinario, y de la diarrea del viajero (Silva *et al*., 2009).

La resistencia a las sulfonamidas en *E. coli* puede tener dos orígenes. Cromosomal por mutaciones en gen DHPS (*folP*), cambiando la afinidad al antibiótico o aumentando la producción de la enzima. La resistencia a nivel plasmídico por adquisición de genes DHPS alternativos (*sul1, 2 y 3*), resultando en menor afinidad por sulfonamidas (Perreten & Boerlin, 2003).

En nuestro estudio se encontró resistencia a trimetroprim sulfametoxazol en 22/64 cepas y se identificaron los genes *sul1* en 5 cepas y *sul2 en* 13. En una cepa se identificó los componentes completos de los integrones tipo 1 *int123*, *sul1* y *qacΔ*. Las cepas negativas pueden tener otros mecanismos de resistencia que expliquen este perfil, por ejemplo los genes *sul3*, los cuales no son evaluados en nuestro estudio y han sido encontrados en porcinos. Perreten & Boerlin, 2003 identificaron en 27 cepas de *E. coli* aisladas de cerdos, la presencia del gen *sul3,* sin encontrar *sul1* ni *sul2.* Más aún

Hammerum *et al.*, 2006 identifican en *E. coli* aisladas de muestras en este mismo modelo en Dinamarca *sul1* en 99 cepas, *sul2* en 110 y *sul3* en 20.

Tampoco se puede descartar la resistencia a nivel cromosomal la cual podría incriminarse por secuenciación del gen *folP o* presencia de casettes genéticos como los *aadA* y *dfrA17* que confieren resistencia a trimetropim (White *et al*., 2000) y no se identificaron en este estudio.

En la granja utilizan un cicatrizante, que contiene una sulfamida, para profilaxis en lechones del área de partos después de ser castrados; en estos animales no se observó resistencia a trimetroprim sulfametoxazol, pero las gestantes pasan por este corral cada vez que tienen sus crías y se exponen varias veces a este ambiente.

Finalmente este trabajo muestra cepas resistentes a antibióticos en la granja estudiada, cuya resistencia es posible asociar fenotípica y genotípicamente caso de las β-lactamasas tipo ampC. La resistencia descrita se relaciona con presión directa ejercida por la administración de diferentes antibióticos, por la forma de administración y los esquemas usados. Se evidencia además resistencia que puede ser ubicada a nivel cromosomal, se confirman genes que codifican a nivel plasmídico *mcr-1*, bla_{CMY-2}, *qnrB* y elementos móviles como la presencia los plásmido IncN, IncF e IncI1. Más aún se encontraron cambios en la ubicación de genes que pasan de ser cromosomales a elementos móviles y que podría reflejar adaptaciones para minimizar el impacto metabólico de su expresión.

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

En este estudio se aislaron cepas *S. aureus* y *E. coli* de porcinos resistentes a distintos grupos de antibióticos de importancia clínica por su uso en humanos y espectro de acción como quinolonas y cefalosporinas de tercera generación. La resistencia encontrada se asocia con el uso de antibióticos en la granja de estudio.

La mayoría de cepas obtenidas son policlones, se encuentran pocos grupos clonales, algunos de estos no comparten el mismo perfil de resistencia, porque estaría a nivel plasmídico.

Se identifica por primera vez el gen *mcr-1* en Colombia, que confiere resistencia a colistina, recientemente descrito a nivel mundial, en porcinos y en humanos.

Se encontraron relaciones entre la resistencia a antibiótico, el fenotipo y el genotipo detectados, para β–lactamasas y colistina al punto que para la cepa de *E. coli* EC96 es posible establecer que los genes *cmt-2* y *mcr-1* respectivamente codificados a nivel plasmídico, explican el fenotipo y la resistencia antibiótica detectados.

En la cepa de *E. coli* EC96 se identificó el gen *qnrB*, pero por antibiograma se consideraba esta cepa como sensible, lo cual en la práctica clínica podría llevar a falla terapéutica.

Recomendaciones

A partir de este estudio es posible sugerir capacitación al personal que trabaja en la granja estudiada para que ellos conozcan la importancia del buen uso de antibióticos y que de esta manera se den cambios en las prácticas de uso de estos medicamentos para minimizar la diseminación de genes que llegan y se acumulan en productos de los animales y el ambiente.

Pocos estudios hay en Colombia sobre el perfil de resistencia a antibióticos en la industria agropecuaria, por tanto se sugiere realizar investigaciones que permitan conocer el estado actual de nuestro país frente a esta problemática y poder generar medidas desde la granja hasta la farmacia.

En cuanto a la metodología se recomienda evaluar la presencia por métodos moleculares del gen *qnrB*, para establecer si más cepas que se excluyeron por su perfil de sensibilidad puedan tener este gen que confiere resistencia.

Anexos

Anexo 1: Sustratos utilizados por el equipo Vitek para identificación de género y especie de bacterias gram negativas y gram positivas.

Identificación Gram Negativos

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	lARL	0.3 mg
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0.3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
10	H2S PRODUCTION	H2S	0.0024 mg
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408 mg
12	Glutamyl Arylamidase pNA	AGLTp	0.0324 mg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0.3 mg
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0.0228 mg
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	OFF	0.45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0.036 mg
18	D-MALTOSE	dMAL	0.3 mg
19	D-MANNITOL	dMAN	0.1875 mg
20	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
21	BETA-XYLOSIDASE	BXYL	0.0324 mg
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	BAlap	0.0174 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
26	LIPASE	LIP	0.0192 mg
27	PALATINOSE	PLE	0.3 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
33	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0.3 mg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0.3 mg
35	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
36	CITRATE (SODIUM)	CIT	0.054 mg
37	MALONATE	MNT	0.15 mg
39	5-KETO-D-GLUCONATE	5KG	0.3 mg
40	L-LACTATE alkalinisation	lLATk	0.15 mg
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
42	SUCCINATE alkalinisation	SUCT	0.15 mg
43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0.0306 mg
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
45	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
46	Glycine ARYLAMIDASE	GlyA	0.012 mg
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	ODC	0.3 mg
48	LYSINE DECARBOXYLASE	LDC	0.15 mg
52	DECARBOXYLASE BASE	ODEC	N/A
53	L-HISTIDINE assimilation	lHSa	0.087 mg
56	COUMARATE	CMT	0.126 mg
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0.0378 mg
58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	O129R	0.0105 mg
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	GGAA	0.0576 mg
61	L-MALATE assimilation	lMLTa	0.042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0.03 mg
64	L-LACTATE assimilation	lLATa	0.186 mg

Identificación Gram positivos

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	D-AMYGDALIN	AMY	0.1875 mg
4	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	PIPLC	0.015 mg
5	D-XYLOSE	dXYL	0.3 mg
8	ARGININE DIHYDROLASE 1	ADH1	0.111 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
11	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
14	CYCLODEXTRIN	CDEX	0.3 mg
15	L-Aspartate ARYLAMIDASE	AspA	0.024 mg
16	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	BGAR	0.00204 mg
17	ALPHA-MANNOSIDASE	AMAN	0.036 mg
19	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
20	Leucine ARYLAMIDASE	LeuA	0.0234 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
24	BETA GLUCURONIDASE	BGURr	0.0018 mg
25	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
26	L-Pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
27	BETA-GLUCURONIDASE	BGUR	0.0378 mg
28	Alanine ARYLAMIDASE	AlaA	0.0216 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
30	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	POLYMIXIN B RESISTANCE	POLYB	0.00093 mg
37	D-GALACTOSE	dGAL	0.3 mg
38	D-RIBOSE	dRIB	0.3 mg
39	L-LACTATE alkalinization	lLATk	0.15 mg
42	LACTOSE	LAC	0.96 mg
44	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	NAG	0.3 mg
45	D-MALTOSE	dMAL	0.3 mg
46	BACITRACIN RESISTANCE	BACI	0.0006 mg
47	NOVOBIOCIN RESISTANCE	NOVO	0.000075 mg
50	GROWTH IN 6.5% NaCl	NC6.5	1.68 mg
52	D-MANNITOL	dMAN	0.1875 mg
53	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
54	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	MBdG	0.3 mg
56	PULLULAN	PUL	0.3 mg
57	D-RAFFINOSE	dRAF	0.3 mg
58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	O129R	0.0084 mg
59	SALICIN	SAL	0.3 mg
60	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0.3 mg
62	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
63	ARGININE DIHYDROLASE 2	ADH2s	0.27 mg
64	OPTOCHIN RESISTANCE	OPTO	0.000399 mg

Anexo 2: Reporte de equipo Vitek de *Biomerieux.*

bioMérieux Colombia SAS

Nº de cliente: 9042-00
Equipo Nº: VK2C

Informe de examen

Editado 24-sep-2014 14:47 COT
Editado por: revisar

Nombre del paciente:
Examen: Y17EC-1

Nº paciente:

Bionúmero: 0405610450026611
Organismo seleccionado: Escherichia coli

Comentarios:	

Información de identificación	**Tarjeta:**	GN	**N° de lote:**	241295810	**Fecha caduc.:**	19-ene-2015 12:00 COT
	Finalizado:	17-sep-2014 14:39 COT	**Estado:**	Final	**Tiempo de análisis:**	3,00 horas
Organismo seleccionado	99% Probabilidad		**Escherichia coli**			
	Bionúmero:	0405610450026611			**Nivel de confianza:**	Identificación excelente
Organismo SRF						
Organismos de análisis y pruebas a separar:						
Mensajes análisis:						
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)						

Información de sensibilidad	**Tarjeta:**	AST-N272	**N° de lote:**	692320520	**Fecha caduc.:**	23-sep-2015 12:00 COT
	Finalizado:	17-sep-2014 19:09 COT	**Estado:**	Final	**Tiempo de análisis:**	7,50 horas
Antibiótico	**CMI**	**Interpretación**	**Antibiótico**		**CMI**	**Interpretación**
BLEE	NEG	-	Ertapenem		<= 0,5	S
Ampicilina/Sulbactam	<= 2	S	Imipenem		<= 0,25	S
Piperacilina/Tazobactam	<= 4	S	Meropenem		<= 0,25	S
Cefoxitina	<= 4	S	Amicacina		<= 2	S
Ceftazidima	<= 1	S	Gentamicina		<= 1	S
Ceftriaxona	<= 1	S	Ciprofloxacino		<= 0,25	S
Cefepima	<= 1	S	Tigeciclina		<= 0,5	S
Doripenem	<= 0,12	S	Colistina			

+= Antibiótico deducido *= AES modificad **= Usuario modificado

Anexo 3: Protocolos de amplificación de los genes del estudio.

Rep-PCR

Iniciadores para Rep-PCR propuestos por Versalovic *et al.*, 1991.

	Iniciadores para Rep-PCR		
Nombre	**Secuencia (5´- 3´)**	**Longitud (pb)**	**Tm**
Rep-PCR- F	III ICG ICG ICA TCI GGC	18	46
Rep-PCR- R	ICG ICT TAT CIG GCC TAC	18	46

Mezcla para Rep-PCR.

MEZCLA PARA REP PCR			
Reactivo	**Concentración Stock**	**Concentración Final**	**Volumen por reacción µl**
Agua HPLC	-	-	12,1
Buffer	10X	1X	2,5
Mg+2	50µM	3µM	1,5
dNTPs	10mM	200uM	0,5
Primer F	20µM	2µM	2,5
Primer R	20µM	2µM	2,5
Taq Platinum	5U/uL	0,1U/uL	0,4
DNA	-	200ng	3,0
Total	-	-	25,0

Protocolo de amplificación Rep-PCR.

Protocolo amplificación REP PCR			
Temperatura		**Tiempo(minutos)**	**N° de ciclos**
94	°C	5	1
94	°C	1	30
46	°C	1:30	30
72	°C	2:30	30
72	°C	20	1
12	°C	∞	1

Resistencia a Quinolonas

Iniciadores para amplificación de genes que confieren resistencia a quinolonas *qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD, qepA, oqxA, oqxB* y *aac(6')-Ib*

Iniciadores para amplificación de genes que confieren resistencia a quinolonas *qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD, qepA, oqxA, oqxB* y *aac(6')-Ib.*					
Iniciadores	**Secuencia (5′–3′)**	**Gen**	**Tm**	**Tamaño pb**	**Referencia**
qnrA-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	*qnrA*	57	619	Xiang Chen *et al.*, 2012
qnrA-R	GCAGCACTATKACTCCCAAGG				
qnrB-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	*qnrB*	57	264	Cattoir *et al.*, 2007
qnrB-R	TTTGCYGYYCGCCAGTCGAA				
qnrC-F	GGGTTGTACATTTATTGAATC	*qnrC*	57	447	Wang *et al.*, 2009
qnrC-R	TCCACTTTACGAGGTTCT				
qnrD-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	*qnrD*	57	582	Cavaco *et al.*, 2009
qnrD-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG				
qnrS-F	GCAAGTTCATTGAACAGGCT	*qnrS*	57	428	Cattoir *et al.*, 2007
qnrS-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG				
qepA-F	CTGCAGGTACTGCGTCATG	*qepA*	60	403	Cattior *et al.*, 2008
qepA-R	CGTGTTGCTGGAGTTCTTC				
oqxA-F	GACAGCGTCGCACAGAATG	*oqxA*	62	339	Xiang Chen *et al.*, 2012
oqxA-R	GGAGACGAGGTTGGTATGGA				
oqxB-F	CGAAGAAAGACCTCCCTACCC	*oqxB*	62	240	Xiang Chen *et al.*, 2012
oqxB-R	CGCCGCCAATGAGATACA				
aac-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	*aac(6')-Ib*	57	482	Park *et al.*, 2006
aac-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT				

Mezcla de reactivos para amplificación de genes que confieren resistencia a quinolonas *qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD, qepA, oqxA, oqxB* y *aac(6')-Ib.*

Mezcla reactivos PCR para amplificación genes *qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD, qepA, oqxA, oqxB* y *aac(6')-Ib-cr*			
Reactivo	**Concentración Stock**	**Concentración Final**	**Volumen por Reacción (µL)**
Buffer	10 x	1 x	21,0
Primer F	10 µM	0,2 µM	0,5
Primer R	10 µM	0,2 µM	0,5
DNA		200ng	3,0
Total			25,0

Protocolo de amplificación genes *qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD,*y *aac(6')-Ib-cr*.

Protocolo amplificación genes *qnrA, qnrB, qnrC, qnrS, qnrD,*y *aac(6')-Ib-cr*			
Temperatura		**Tiempo(minutos)**	**N° de ciclos**
94	°C	5	1
94	°C	1	30
57	°C	1	
72	°C	1	
72	°C	5	1
10	°C	∞	1

Protocolo de amplificación gen *qepA.*

Protocolo amplificación gen *qepA*			
Temperatura		Tiempo(minutos)	N° de ciclos
95	°C	3	1
95	°C	1	30
60	°C	1	
72	°C	1	
72	°C	10	1
10	°C	∞	1

Protocolo de amplificación genes *oqxA y oqxB.*

Protocolo amplificación genes *oqxA y oqxB*			
Temperatura		Tiempo(minutos)	N° de ciclos
95	°C	3	1
95	°C	1	30
62	°C	1	
72	°C	1	
72	°C	10	1
10	°C	∞	1

Amplificación genes que confieren resistencia a β-lactamasas

Iniciadores para multiplex I: TEM, SHV y OXA-1-like.

Multiplex I: TEM, SHV y OXA-1-like					
Iniciadores	**Secuencia (5′–3′)**	**Genes**	**Tm**	**Tamaño**	**referencia**
MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	*TEM-1 y TEM-2*	60	800	Dallene *et al.*, 2010
MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC				
MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	*SHV-1*	60	713	
MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC				
MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	*OXA-1, OXA-4 y OXA-30*	57	564	
MultiTSO-O_rev	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG				

Iniciadores para Multiplex II: CTX-M grupo 1, grupo 2 y grupo 9.

Multiplex II: CTX-M grupo 1, grupo 2 y grupo 9					
Iniciadores	Secuencia (5′–3′)	Genes	Tm	Tamaño	Referencia
MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA*	Variantes de: CTX-M grupo 1 incluye: CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-15	60	688	Dallene *et al.*, 2010
MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT*				
MultiCTXMGp2_for	CGTTAACGGCACGATGAC	Variantes de: CTX-M grupo 2: incluye CTX-M-2	60	404	
MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT*				
MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	Variantes de: CTX-M grupo 9: incluye CTX-M-9 y CTX-M-14	60	561	
MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG				

Iniciadores para CTX-M grupo 8/25.

CTX-M grupo 8/25				
Iniciadores	**Secuencia (5′–3′)**	**Genes**	**Tm**	**Tamaño**
CTX-Mg8/25_for	AACRCRCAGACGCTCTAC*	*CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39, CTX-M-40 y CTX-M-41*	60	Dallene *et al.*, 2010
CTX-Mg8/25_rev	TCGAGCCGGAASGTGTYAT*			

Iniciadores para Multiplex III: ACC, FOX, MOX, DHA, CIT y EBC.

Multiplex III: ACC, FOX, MOX, DHA, CIT y EBC					
Iniciadores	**Secuencia (5′–3′)**	**Genes**	**Tm**	**Tamaño**	**Referencia**
MultiCaseACC_for	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	*ACC-1 y ACC-2*	60	346	Dallene *et al.*, 2010
MultiCaseACC_rev	GTTAGCCAGCATCACGATCC				
MultiCaseFOX_for	CTACAGTGCGGGTGGTTT	*FOX-1 a FOX-5*	60	162	
MultiCaseFOX_rev	CTATTTGCGGCCAGGTGA				
MultiCaseMOX_for	GCAACAACGACAATCCATCCT	*MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11 y CMY-19*	60	895	
MultiCaseMOX_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA				
MultiCaseDHA_for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	*DHA-1 y DHA-2*	60	997	
MultiCaseDHA_rev	GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG				
MultiCaseCIT_for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	*LAT-1, LAT-2, LAT-3, BIL-1, CMY-2 a CMY-7, CMY-12 a CMY-18, CMY-21, CMY-22 y CMY-23*	60	538	
MultiCaseCIT_rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY*				
MultiCaseEBC_for	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	*ACT-1 y MIR-1*	60	683	
MultiCaseEBC_rev	AGCCTAACCCCTGATACA				

Iniciadores para Multiplex IV: VEB, PER y GES.

Multiplex IV: VEB, PER y GES					
Primer	**Secuencia (5′–3′)**	**Genes**	**Tm**	**Tamaño**	**Referencia**
MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	GES-1 a GES-9 yGES-11	60	399	Dallene *et al.*, 2010
MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT				
MultiPER_for	GCTCCGATAATGAAAGCGT	PER-1 y PER-3	60	520	
MultiPER_rev	TTCGGCTTGACTCGGCTGA				
MultiVEB_for	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	VEB-1 a VEB-6	60	648	
MultiVEB_rev	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG				

Mezcla de reactivos para amplificación de genes que codifican para β-lactamasas.

Mezcla reactivos PCR para amplificación de genes que codifican para β-lactamasas			
Reactivo	**Concentración Stock**	**Concentración Final**	**Volumen por Reacción (µL)**
Agua			12,6
Buffer	10 x	1 x	2,5
$MgCl_2$	25 uM	3 uM	3,0
Mezcla de dNTP´s	10 mM	200 µM	0,5
Primer F	10 uM	0,4uM	1,0
Primer R	10 uM	0,4uM	1,0
Primer F	10 uM	0,4uM	1,0
Primer R	10 uM	0,4uM	1,0
Primer F	10 uM	0,4uM	1,0
Primer R	10 uM	0,4uM	1,0
Taq ADN polimerasa	5 U/µL	0,08 U/µL	0,4
Total			22

Protocolo de amplificación genes que codifican para β-lactamasas.

Protocolo amplificación para β-lactamasas			
Temperatura		**Tiempo(minutos)**	**N° de ciclos**
94	°C	10	1
94	°C	0:40	30
60	°C	0:40	
72	°C	1	
72	°C	7	1
10	°C	∞	1

Amplificación gen *MCR-1*que confieren resistencia a colistina

Iniciadores para gen *MCR1.*

	Iniciadores para gen *MCR1*		
Nombre	**Secuencia (5´- 3´)**	**Tm**	**Tamaño**
MCR-1 F	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	46	309
MCR-1 R	CTTGGTCGGTCTGTA GGG	46	

Mezcla para para gen *MCR1.*

Mezcla para gen *MCR1*			
Reactivo	**Concentración Stock**	**Concentración Final**	**Volumen por reacción (µL)**
Agua HPLC	-	-	16,85
Buffer	10X	1X	2,50
Mg+2	25uM	1,5uM	1,50
dNTPs	10mM	200uM	0,50
Primer F	20uM	0,4uM	0,50
Primer R	20uM	0,4uM	0,50
Taq Platinum	5U/uL	0,03U/uL	0,15
DNA	-	200ng	2,50
Total	-	-	25

Protocolo de amplificación gen *MCR1*.

Protocolo amplificación genes *MCR1*			
Temperatura		**Tiempo(minutos)**	**N° de ciclos**
94	°C	5	1
94	°C	0:30	30
45	°C	0:30	
72	°C	0:30	
72	°C	5	1
10	°C	∞	1

Amplificación *genes int123, sul1, su2* y *qacΔ*.

Iniciadores para gen *int123, sul1, su2* y *qacΔ.*

Iniciadores para amplificar gen *int123, sul1, su2* y *qacΔ.*					
Primer	**Secuencia (5′–3′)**	**Genes**	**Tm**	**Tamaño**	**Referencia**
Int123_for	TGCGGGTYAARGATBTKGATTT	*Int 1,2 y 3*	49	491	White *et al*., 2000
Int123_rev	CARCACATGCGTRTARAT				
Sul1_for	TGGTGACGGTGTTCGGCATTC	*sul1*	60	789	Sáenz *et al*., 2004
Sul1_rev	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG				
Sul2_for	CGGCATCGTCAACATAACC	*sul2*	50	722	
Sul2_rev	GTGTGCGGATGAAGTCAG				
qacΔ _for	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	*qacΔ*	60	274	
qacΔ _rev	TGAGCCCCATACCTACAAAGC				

Mezcla para para gen *int123, sul1, su2* y *qacΔ*.

Mezcla para gen *int123, sul1, su2 y qacΔ.*			
Reactivo	**Concentración Stock**	**Concentración Final**	**Volumen por reacción**
Agua HPLC	-	-	16,3
Buffer	10X	1X	2,5
Mg+2	25uM	1,5uM	1,5
dNTPs	10mM	200uM	0,5
Primer F	10uM	0,2uM	0,5
Primer R	10uM	0,2uM	0,5
Taq Platinum	5U/uL	0,04U/uL	0,2
DNA	-	200ng	3,0
Total	-	-	25,0

Protocolo de amplificación gen *int123*.

Protocolo amplificación genes *int123*			
Temperatura		**Tiempo(minutos)**	**N° de ciclos**
95	°C	5	1
95	°C	1	30
49	°C	1	
72	°C	1	
72	°C	5	1
10	°C	∞	1

Protocolo de amplificación gen *sul2*.

Protocolo amplificación genes *sul2*			
Temperatura		**Tiempo(minutos)**	**N° de ciclos**
95	°C	5	1
95	°C	1	30
50	°C	1	
72	°C	1	
72	°C	5	1
10	°C	∞	1

Protocolo de amplificación gen *sul1* y *qacΔ*.

Protocolo amplificación genes sul*1* y *qacΔ*			
Temperatura		**Tiempo(minutos)**	**N° de ciclos**
95	°C	5	1
95	°C	1	30
60	°C	1	
72	°C	1	
72	°C	5	1
10	°C	∞	1

Amplificación grupos de incompatibilidad

Iniciadores para grupos de incompatibilidad.

Nombre	Secuencia DNA	Objetivo	Tamaño amplicon (pb)	Referencia
HI1 FW	5′-ggagcgatggattacttcagtac-3′	parA-parB	471	Carattoli *et al.*, 2005
HI1 RV	5′-tgccgtttcacctcgtgagta-3′			
HI2 FW	5′-tttctcctgagtcacctgttaacac-3′	iterons	644	
HI2 RV	5′-ggctcactaccgttgtcatcct-3′			
I1 FW	5′-cgaaagccggacggcagaa-3′	RNAI	139	
I1 RV	5′-tcgtcgttccgccaagttcgt-3′			
X FW	5′-aaccttagaggctatttaagttgctgat-3	ori γ	376	
X RV	5′-tgagagtcaatttttatctcatgttttagc-3			
L/M FW	5′-ggatgaaaactatcagcatctgaag-3′	repA,B,C	785	
L/M RV	5′-ctgcaggggcgattctttagg-3′			
N FW	5′-gtctaacgagcttaccgaag-3′	repA	559	
N RV	5′-gtttcaactctgccaagttc-3′			
FIA FW	5′-ccatgctggttctagagaaggtg-3′	iterons	462	
FIA RV	5′-gtatatccttactggcttccgcag-3′			
FIB FW	5′-ggagttctgacacacgattttctg-3′	repA	702	
FIB RV	5′-ctcccgtcgcttcagggcatt-3′			
W FW	5′-cctaagaacaacaaagcccccg-3′	repA	242	
W RV	5′-ggtgcgcggcatagaaccgt-3′			
Y FW	5′-aattcaaacaacactgtgcagcctg-3′	repA	765	
Y RV	5′-gcgagaatggacgattacaaaacttt-3′			
P FW	5′-ctatggccctgcaaacgcgccagaaa-3′	iterons	534	
P RV	5′-tcacgcgccagggcgcagcc-3′			
FIC FW	5′-gtgaactggcagatgaggaagg-3′	repA2	262	
FIC RV	5′-ttctcctcgtcgccaaactagat-3′			
A/C FW	5′-gagaaccaaagacaaagacctgga-3′	repA	465	
A/C RV	5′-acgacaaacctgaattgcctcctt-3′			
T FW	5′-ttggcctgtttgtgcctaaaccat-3′	repA	750	
T RV	5′-cgttgattacacttagctttggac-3′			
FIIS FW	5′-ctgtcgtaagctgatggc-3′	repA	270	
FIIS RV	5′-ctctgccacaaacttcagc-3′			
FrepBFW	5′-tgatcgtttaaggaattttg-3′	RNAI/repA	270	
FrepB RV	5′-gaagatcagtcacaccatcc-3′			
K/B FW	5′-gcggtccggaaagccagaaaac-3′	RNAI	160	
K RV	5′-tctttcacgagcccgccaaa-3′			
B/O RV	5′-tctgcgttccgccaagttcga-3′	RNAI	159	

Mezcla para grupos de incompatibilidad.

Mezcla reactivos PCR para amplificación de genes que codifican grupos de incompatibilidad			
Reactivo	**Concentración Stock**	**Concentración Final**	**Volumen por Reacción (µL)**
Agua			2.375
Buffer	10 x	1 x	2,5
$MgCl_2$	25 uM	1,5 uM	1,5
Mezcla de dNTP´s	10 mM	200 µM	0,5
Primer F	10 uM	1uM	2,5
Primer R	10 uM	1uM	2,5
Primer F	10 uM	1uM	2,5
Primer R	10 uM	1uM	2,5
Primer F	10 uM	1uM	2,5
Primer R	10 uM	1uM	2,5
Taq ADN polimerasa	5 U/µL	0,025 U/µL	2,5
Total			22

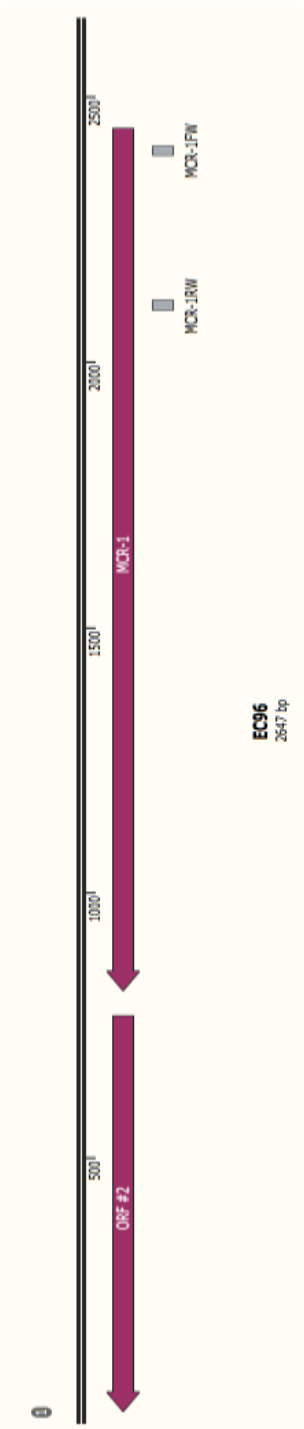
Protocolo de amplificación grupos de incompatibilidad.

Protocolo amplificación grupos de incompatibilidad			
Temperatura		**Tiempo(minutos)**	**N° de ciclos**
94	°C	5	1
94	°C	1	30
60	°C	1	
72	°C	1	
72	°C	5	1
10	°C	∞	1

Anexo 4: Secuencia del gen *mcr- 1* de la cepa *E. coli* EC96

>contig_171

CTTGGATTGTAAATTCAGCCGATTAAACTTGTTCACCCTTCTTAAAAAACACCCACGCAA
GCCCTGCCGACATCGCCCACGCAAGCATCATCGACACCACCGTATGGCTCAAAAAATGAT
CGCCAATAATCATCTTATAGCAGCCCATCGCCCAGCCCAATGCCATCACCACGATGATGA
TCGCACCACGACGGCGGCGCAAACTTGGCGCAAACGCAAAGGCAAACAGCGCAAATCCGC
TACTGGCATGCGCCGCAGGAAAGCACTTATCAGGAATGGTGTTACGCATACTATCAAGCA
TCGGCAAATACGGCAGCGTACCATCAAAAATCGTCAAATGCACAGGGCAGACCACATGAG
TATATGCCTTCAATGACGCGACAACTGTCGGCACTAGGATCAAAGTCAGCACCAGATACG
CAAGCTCACGCACGCGAAATTTTGTCACTGGGACAAGCCACTTGGCAGTGATAGCATTGC
CCTTTTTCTCATGATAAGCACGGCAAATGGTCGCAACCAGCAAGTAGATCAGCATCGCCA
TCAGCAGCTTTTTTAGTCCAGAATACAGTAGCAAATCTGGCAAAAAAGCTTGCTTGGCAA
CCATCCAATGCCCCATACCCAGATAAAACCAATCAGCGACCATCAGATCAATCTGACTGT
GCTCAAGGGTCAGCGTGGCAACGATCGCCATGACAAGAGCGATACTCATCTCAGCAAGTA
GGCGTTTATTTGATAAATACGGCATAACAAACCCCACCCCACCGCCCATAATACGAATGG
AGTGTGCGGTGGGTTTGGAAAAAATACAGGGAGAAATCAGCGGATGAATGCGGTGCGGTC
TTTGACTTTGTCCGCGGTGACATCAAACAGCTTTAATAATGTCGGCGTGATCGCGTCATG
GGTCAGGACGGTATCGGTTGCCATTGGCGTGATGCCAGTTTGCTTATCCGTCCAGAAAAA
TGCAGGCACACTGCGCTGTTCTTTTGGTGCAAAGGCATTTGGCATACCATGTAGATAGAC
ACCGTTCTCACCCAGACTTTCGCCATGATCGCTGACATACAGCATTGAGACATCATAGGC
ATTGCTGTGCGTCTGCAGCCACTGGATACTTTGAGCGATGAAATCATCGGTGGCAAGCAA
GGCATTGTCATAAGCATTGATCAAGGACTGATGTTCGCACTTGGCAAGCTCATTACCTTC
ACACACTGGCGTGAATTTGGCAAACTTTTCATCATATCGCTTAAAATACGCAGGCCCGTG
ATTGCCCATTTGGTGCAGCATGATCAGCATATCTTTGCCGTTATTGGCAGCGACAAAGTC
ATCTAAGCCAACGAGCATACCGACATCGCGGCATTCGTTATAAGGATTGGTGTTGCAGAT
GGCGTTGTTGGTCGCGGATTTATAATCGGCAAATTGCGCTTTTGGCAGCTTATCCATCAC
GCCTTTTGAGTCCGAATTATTATCACGCCACAAGATACTTACGCCCAAGCGATCCAGCGT
ATCCAGCACATTTTCTTGGTATTTGGCGGTATCGACATCATACTCATCCGCGCCCAGATA
GCTGAACATACACGGCACAGAATACGCCGTCGATGTGCCGCACGATGTGACATTGCTAAA
ATTGGTCACGCCATCGATCTTGGCAAGCTGTGGGAAAGTATCGCGCTCATAGCCATTGAA
GCTGACATGATCGGCGCGTGCCGTCTCACCGACGACGAACACCACTAGGCGTGGCTTACG
CATATCAGGCTTGGTTGCTTGTACCGCGTCTTTGGCGTGATAAATGGTATCTTTTGGCGC
ACTGGCTTTTTTATACTCAATACTGGCAAGCTTACCCACCGAGTAGATTGGCATGATCGG
ATTGACATAGCTACGCAGCGGCTTATGCACGCGAAAGAAACTGGCATAATGACTGCTGAA
CGCCACCACAGGCAGTAAAATCAGCGCAAGACTTGCCACGATCAAGCCCAATCGGCGCAT
CAAACCCTTGCCCCAAGTCGGATAATCCACCTTAACAAAAGCCACAAGCAAACTTGGTAG
CACACCCAAACCAATGATACGCATGATAAACGCTGCGTTTAATAGATCCTTGGTCTCGGC
TTGGTCGGTCTGTAGGGCATTTTGGAGCATGGTCGTATCATAGACCGTGCCATAAGTGTC
AGTAAAATAACTGGTCACCGCGCCCATGATTAATAGCAAAATCAACACAGGCTTTAGCAC
ATAGCGATACGATGATAACAGCGTGGTGATCAGTAGCATCGCGCCAAAGAGCACGACAGC
GATCGTCAGCACAAAGCCGAGATTGTCCGCGATGGGATAGGTTTGGCTGATTTTATCAAA
AAAGGTAAGATTGGCGGTCGCGGTCAAGAAAACGGCAACACTCGCCACAAGAACAAACGG
ACTGACCGAGCGTCGGTACCACACAGAAGTATGCTGCATCATGAGAAACTACTCAAAAAA
TAAACGGTGGGATAATTGCGGCAATTATACTGCAATTTTTTAAGAAATCCAGTACAATTT
ATCTGATATAAAAAATTATGCGATACAGAAATATTTCAGAAATTTTATTAGGCAATCATT
GCGCAATCCCATACTGAATATACACTTGAGAGTATTTATAATTTGTATCTTGAATTGTCA
AACCAAG


0
500
1000
1500
2000
2500
ORF #2
MCR-1
MCR-1RW
MCR-1FW
EC96
2647 bp

Bibliografía

Asbel, F., Santos, J., bolivar, j., & Cardenas, e. (2000). Cephalosporins. *antibacterial, 14*(2), 435-447.

Asbel, L. E., & Levison M. E., (2000). Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. *Antibacterial therapy pharmacodynamics,pharmacology, newer agents. 14(2) 435-447.*

Bean, D. C., Livermore, D. M., Papa, I., Lucinda M. C., y Hall, R. M. (2005). Resistance among Escherichia coli to sulphonamides and otherantimicrobials now little used in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 56, 962–964.

Beconi, B., Roof, R. D. Millerioux, L., Kausche, F. M., Smith, E. B., Callahan, J. K., Hubbard. V. L., Smith, G.A., & Gilbertson, T.J. (1995) Determination of ceftiofur and its desfuroylceftiofur-related metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* B, 673, 231-244.

Beyer, A., Baumann. S., Scherz G., Stahl, J., Berge, M., Friese, A., Roesler, U. Kietzmann, M., & Honscha, W. (2015) Effects of ceftiofur treatment on thesusceptibility of commensal porcine E.coli –comparison between treated and untreated animals housed in the same stable. *BMC Veterinary Research*, 11, 265.

Bush, K.. (2013).The ABCD's of b-lactamase nomenclature. *J Infect Chemother.* 19,549–559.

Bush, K., & Jacoby G. (2010). MINIREVIEW Updated Functional Classification of B-Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976.

Cabello. (2003) Antibióticos y acuicultura un análisis de sus potenciales impactos para el medio ambiente, la salud humana y animal en chile. Análisis de políticas públicas, APP17, 1-15.

Cambray, G., Guerout, A., y Maze, D. (2010). Integrons. Annu. *Rev. Genet,* 44, 141–66.

Carattoli, A., Bertinia, A., Villaa, L., Falbob, V., Hopkinsc, K., L., & Threlfallc, E., T. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. Journal of *Microbiological Method*s, 63, 219– 228.

Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother*. 60: 394 –397.

Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an Escherichia coli isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52:3801–3804.

Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. 2009. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enterica serovars Kentucky and Bovismorbificans of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 53:603–608.

Choi, C., Ham, H., Kwon, D., Kim, J., Cheon, D., Min, K., Cho, W., Chung, T… (2002). Antimicrobial susceptibility of pathogenic E. coli isolate from pigs in Korea. J*. Vet. Med. Sci*, 64(1), 71-73.

Celis, A. Y. (2012). Origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. Examen calificación. Doctorado Salud Pública Universidad Nacional de Colombia.

Chen, X., Zhang, W., Pan, W & Yin, J., Pan, X., Gao, S., & Jiao, X. (2012). Prevalence of qnr, aac(6¢)-Ib-cr, qepA, and oqxAB in Escherichia coli Isolates from Humans, Animals, and the Environment. *Antimicrob. Agents Chemother*. 56(6), 3423- 3437.

Escudero, E., Vinué, L., Teshage, T., Torres, C., & Moreno. (2010) Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal Escherichia coli isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain*. Research in Veterinary Science*, 88, 83–87.

Collis C. M., y Hall R. M. (1995). Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39 (1),155–162.

Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M. J., Lito, L. M., Cristino, J. M., Mendo, S. y Duarte, A. (2003). Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2838–2843.

Dallenne, C., Da Costa, A., Decre, D., Favier, C., and Arlet G. (2010).Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*; 65, 490–495.

Datta, N., y Hedges, R.W. (1971). Compatibility groups among fi-R factors. *Nature,* 234, 222–223.

Datta, N., Hughes, V.M., 1983. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics*. Nature,* 306, 616– 617.

Di conza J. A., y Gutkind, G. O. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología,* 42, 63-78.

Gobernado, M,, y López, J. L. (2003). Identificación bacteriana. *Enferm Infecc Microbiol Clin,* 21(2), 54-60.

Ghamrawi, N., Neuner, e. & Rehm, n. (2015) Ceftaroline fosamil: A super-cephalosporin?. *Cleveland clinic journal of medicine*, 82(7), 437-444.

Hall, R. M., Brown, H. J., Brookes D. E. y Stokes H. W. (1994). Integrons Found in Different Locations Have Identical 5' Ends but Variable 3' Ends. *Journal of Bacteriology,* 176(20), 6286-6294.

Hall, R. M., y Collis C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 15(4), 593-600.

Hammerum, A. M., Sandvang, D., Andersen, S. R., Seyfarth, A. M., Porsbo, L. J., Møller, N. F., & Heuer, O. E.(2006). Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant Escherichia coli isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 235 – 237.

Hansson, K., Sundström, K., Pelletier, A., & Roy, P. H. (2002). IntI2 Integron Integrase in Tn7*. Journal of Bacteriology*, 184(6), 1712–1721.

Karczmarczyk M., Martins, M., McCusker, M., Mattar, S., Amaral, L., Leonard, N., Aarestrup, F., & Fanning, S. (2010) Characterization ofantimicrobial resistance in *Salmonella enterica* foodand animal isolates from Colombia: identi¢cation of a qnrB19 mediated quinolone resistance marker in two novel serovares*. FEMS Microbiol Lett*, 313, 10–19.

Koonin, E. V., & Wolf, Y. I. (2009). Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? *Biology direct,* 4, 42. doi:10.1186/1745-6150-4-42

Lara, F. J., Del Olmo M., Cruces, C., Quesada, C., García, Ana. (2012). Advances in the determination of b-lactam antibiotics by liquid chromatography*. Trends in Analytical Chemistry,* 38, 52-66.

Catrya, B., Cavalerib , M., Baptistec, K., Graveb , K., Greinb , K., Holmc, A., Jukesd , H., Liebanae , E… (2015)Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents,* 46, 297–306.

Lederberg, J. (2000). Infectious history. Science, 288(5464), 287–293.

Levy, S B, & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med,* 10(12), S122–9.

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spence, J., Doi, Y., Tian, G… (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 16, 161–68.

Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clin Microbiol Rev, 24(4), 718–733.

Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants*. Environ Pollut, 157*(11), 2893–2902.

Novick, R. (1987). Plasmid incompatibility. Microbiological Reviews, 51(4), 381-395.

Peleg, A. y Hooper D. C., (2010). Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *The New England Journal of Medicine*, 362(19), 1804-1813.

Perreten, V., y Boerlin, P. (2003). A New Sulfonamide Resistance Gene (sul3) in Escherichia coli Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 47(3), 1169–1172.

Rayamajhi, N., Kang, S. G., Lee, D. Kang, M., Lee, S., & Park K. Y. (2008). Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type β-lactamases from cephalosporinresistant Enterobacteriaceae isolated from swine. International *Journal of Food Microbiology,* 124, 183-187.

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. 2006. Prevalence in the United States of aac(6=)-Ib-cr encoding a ciprofloxacinmodifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother*. 50:3953–3955.

Quesada, A., Ugarte, M., Iglesias, R., Porrero, C., Martínez, R., Florez, D., Campos, M., García, M... (2016). Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from poultry and swine in Spain. *Research in Veterinary Science*, 105, 134–135.

Seimc. (2011). Procedimientos en Microbiología Clínica

Sabaté, M., y Prats, G. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 20(7), 341-345.

Saenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, animal, and Food Origins. A*ntimicrobial agents and chemotherapy*, Oct, 3996–4001.

Salviati, C., Laube, H., Guerra, B., Roesler, & U., Friese, A. (2015) Emission of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from pig fattening farms to surrounding areas. *Veterinary Microbiology*, 175, 77–84.

Secretaria Distrital de Salud. (2015). *Boletín de Resistencia Bacteriano* 2014.

Stanley & Kenneth K. M. (2004) Beta-lactam antibiotics: newer formulations and newer agents. *Infect Dis Clin*, 18, 603–619.

Torres, C. López, M. J. (octubre, 2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de fleming. Discurso leído en el Acto de su recepción académica. Zaragoza. Recuperado de: http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf

WHA67.25,(Mayo, 2014). Resistencia a los antimicrobianos. 67.ª Asamblea mundial de la salud.

White, P. A., McIver, C. J., Deng, Y. M., & Rawlinson, W. D. (2000). Characterisation of two new gene cassettes, aadA5 and dfrA17. *FEMS Microbiology Letters*,182, 265-269

Xu, H., Davies, J., y Miao, V. (2007). Molecular Characterization of Class 3 Integrons from *Delftia* spp. *Journal of bacteriology*, 189(17). 6276–6283.

.Wang M, et al. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in clinical isolate of Proteus mirabilis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 53:1892–1897.

http://es.slideshare.net/rosaluzf1/plasmido-todo?next_slideshow=1