



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



**DETECCIÓN DE CUATRO GENES DE RESISTENCIA A TETRACICLINAS EN
BACTERIAS NOSOCOMIALES GRAM NEGATIVAS, AISLADAS
EN RECINTOS HOSPITALARIOS VETERINARIOS.**

DAVID ALEJANDRO OYARCE VARGAS

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

PROFESOR GUÍA: DRA. MARÍA ANTONIETA JARA OSORIO

SANTIAGO, CHILE

2011

DEDICATORIA.

Dedico este trabajo a mi familia, en primer lugar a mis padres, Iván Oyarce y Gloria Vargas por su entrega, esfuerzo, dedicación y amor, entre innumerables valores que me han traspasado e inculcado, siendo para mí pilares fundamentales de todo. Dedico este esfuerzo también a mis hermanos, quienes fueron mi apoyo e imagen, sonrisa y compañía, en quienes sus metas también me vi reflejado, para ellos lo logrado fue alimentado incluso en sus vivencias.

Además, dedico esta Memoria de Título, a quienes partieron antes de poder ver esto y estoy seguro era motivo de alegría y que desde allá arriba han disfrutado e incluso se han enorgullecido. Para ustedes abuelos Luis Oyarce y Juan Vargas, que no conocí en vida, sin embargo, se que estarían contentos; para ti abuelita Irma que fuiste un gran ejemplo de vida a seguir y para Lorena Providel , esposa de mi hermano mayor Iván , allá en el cielo estás feliz y sabes como cuidamos a tu niña, mi sobrina Antonella.

Para todas aquellas personas que fueron al menos parte de esto y que me entregaron su apoyo, paciencia, alegría, compañía, sensibilidad, comprensión y que no dudaron en mí.

Este trabajo y largo trayecto, va cimentado también en dos amiguitos míos, cuya fidelidad fue incomparable , incluso propulsores de esto, Kazán y Zarko, a pesar que no podía escuchar su voz o no me hablaron, en sus ojos vi mi sueño, esto también para y por ustedes.

AGRADECIMIENTOS.

En estas líneas quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a aquellas personas que ayudaron a forjar este lindo camino de sacrificio y constancia y que aportaron con mucho más que su presencia para realizar esta memoria y así, lograr cumplir mi meta de obtener el título de Médico Veterinario. En primer lugar, quisiera agradecer a mi profesora guía, la doctora María Antonieta Jara Osorio, su gran apoyo, atención, consejo, sensibilidad y comprensión, junto con sus importantísimas enseñanzas desde que me tocó como académica en aquel año 2004 , pasando por las tutorías el año 2005 y posteriormente, la realización de este trabajo. Además, quisiera agradecer a los funcionarios del departamento de Medicina Preventiva en general, por su disponibilidad y tiempo en varios pasajes de mi estadía en aquel lugar.

Agradezco también, el apoyo y el amor incondicional de mi familia, primeramente a mis padres, Iván Oyarce y Gloria Vargas, su inigualable amor, apoyo, presencia, motivación, consejo, ese constante esfuerzo y entrega hacia sus hijos, con esos incomparables y múltiples ejemplos de vida, me han transmitido valores y enseñanzas en mi andar y sin excepción en esta memoria, para el logro de mis metas soñadas como mi título. A mis hermanos, Iván Oyarce y Luis Oyarce que con su ímpetu, lealtad, cariño, consejo, amistad, motivación en cada momento, con necesidad o no de ello e incluso paciencia para saber llevar mi forma de estudio, me ayudaron a realizar y cumplir este objetivo al igual que los otros que la vida me ha dado la oportunidad de concretarlos.

Gracias a todos aquellos que fueron al menos parte de esto, contribuyeron de alguna forma en este proceso y cuya presencia no dejó de ser considerable o valorable para mí.

Finalmente, agradezco a Dios por todo lo que me ha entregado en este camino y se que seguirá entregándome en esta vida.

ÍNDICE	Página
RESUMEN	vii
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Infecciones nosocomiales.....	3
2.2 Agentes bacterianos nosocomiales.....	3
2.3 Situación epidemiológica de las infecciones nosocomiales.....	4
2.4 Resistencia bacteriana.....	5
2.4.1 Desarrollo e importancia de la resistencia en las infecciones nosocomiales.....	5
2.4.1.1 Factores que contribuyen al desarrollo de resistencia	7
2.4.2 Mecanismos de transferencia de ADN y elementos genéticos participantes.....	8
2.4.3 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	11
2.5 Bacterias Gram negativas: implicancias de su presencia y del fenómeno de multiresistencia.....	13
2.6 Tetraciclinas: antimicrobianos de reducida efectividad.....	13
2.6.1 Mecanismo de acción de las Tetraciclinas.....	14
2.6.2 Resistencia bacteriana a las Tetraciclinas.....	15
2.6.3 Mecanismos de resistencia a Tetraciclinas.....	15
2.6.3.1 Mecanismo de Expulsión Activa.....	16
2.6.3.2 Mecanismo de Protección Ribosomal.....	17
2.6.3.3 Familias de bombas de eflujo y su efecto sobre la acción de las tetraciclinas.....	18

2.7	Vigilancia epidemiológica de la resistencia bacteriana.....	19
2.7.1	Microbiología Clásica.....	19
2.7.2	Microbiología Molecular.....	20
2.7.2.1	La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	21
	OBJETIVOS.....	23
3.		
3.1	Objetivo general	23
3.2	Objetivos específicos	23
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1	Diseño experimental	24
4.2	Muestras	24
4.3	Obtención del ADN bacteriano	26
4.4	Detección de genes mediante la técnica de PCR	27
4.4.1	Partidores	27
4.4.2	Mezcla de la reacción para realizar la prueba de PCR	27
4.4.3	Amplificación del ADN	28
4.5	Visualización de los productos amplificados	28
4.6	Normas de bioseguridad en el laboratorio	29
5.	RESULTADOS	30
5.1	Detección de los genes <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , que codifican proteínas de eflujo activo y genes <i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i> que codifican proteínas de protección ribosomal en bacterias nosocomiales Gram-negativas ambientales mediante técnica de PCR convencional, año 2007.....	30
5.2	Detección de los genes <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , que codifican proteínas de eflujo activo y genes <i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i> que codifican proteínas de protección ribosomal en bacterias nosocomiales Gram-negativas ambientales mediante técnica de PCR convencional, año	

2008	31
6. DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIONES	36
8. ANEXO	37
9. BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE CUADROS

Página

1. Mecanismos de resistencia caracterizados para los genes <i>tet</i> y <i>otr</i>.....	16
2. Bacterias nosocomiales Gram negativas obtenidas durante el año 2007 y su perfil de susceptibilidad a un panel de antimicrobianos (según Kirby-Bauer)...	25
3. Bacterias nosocomiales Gram negativas obtenidas durante el año 2008 y su perfil de susceptibilidad a un panel de antimicrobianos (según Kirby-Bauer)...	26
4. Partidores.....	27
5. Protocolos para Amplificación de ADN.....	28
6. Bacterias nosocomiales Gram negativas, resistencia a tetraciclinas y presencia /ausencia de genes de resistencia (año 2007).....	30
7. Bacterias nosocomiales Gram negativas, resistencia a tetraciclinas y presencia /ausencia de genes de resistencia (año 2008).....	31

RESUMEN.

Las infecciones nosocomiales de origen bacteriano constituyen una preocupación constante y creciente tanto en el ámbito de la salud pública como en el de la salud animal, debido a que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad. Entre los factores que explican esta condición, está el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, siendo cada vez más frecuente el fenómeno de multiresistencia en las cepas involucradas.

Entre los antimicrobianos que han visto reducida su efectividad se encuentra el grupo de las tetraciclinas, fármacos de amplio espectro utilizados con diferentes fines terapéuticos. Las bacterias resistentes a estos antimicrobianos presentan genes denominados *tet*, describiéndose en la actualidad 43 de ellos que codifican, principalmente, proteínas de eflujo activo y proteínas de protección ribosomal.

El objetivo de este trabajo fue la detección de cuatro genes de resistencia a tetraciclinas- *tet(A)* y *tet(B)*, involucrados en la codificación de proteínas de eflujo y *tet(M)* y *tet(O)*, involucrados en la codificación de proteínas de protección ribosomal- mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en cepas bacterianas Gram negativas ambientales descritas como nosocomiales, previamente aisladas y caracterizadas en los años 2007 y 2008.

La aplicación de esta técnica de biología molecular permitió detectar en cepas fenotípicamente resistentes mediante antibiograma por difusión en agar, al menos uno de los cuatro genes de resistencia a tetraciclinas. En un alto porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia también se detectó al menos un gen de resistencia y en algunas cepas sensibles a tetraciclinas se obtuvo este mismo resultado.

Los resultados de este trabajo señalan que la detección de genes *tet* complementaría la técnica del antibiograma de la Microbiología clásica en el estudio de la resistencia bacteriana a tetraciclinas.

SUMMARY.

Nosocomial infections caused by bacteria has become a constant and growing concern for both, public and animal health because they determinate high morbidity and mortality rates. One of the factors that explain this condition is the increasing bacterial resistance to antibiotics of the strains involved, causing a more frequent appearance of the multidrug resistance phenomenon.

Among the antimicrobial agents, tetracyclines which are broad-spectrum compounds used for different therapeutic purposes have reduce their effectiveness against bacteria. Resistant strains to this antibiotics present *tet* genes, being described currently 43 of them which principally encode for active efflux proteins and ribosomal protection proteins.

The purpose of this work was to detect four tetracycline resistance genes- *tet* (A) and *tet* (B) which are involved in the codification of efflux proteins, and *tet* (M) and *tet* (O) involved in the codification of ribosomal protection proteins- by the Polymerase Chain Reaction (PCR). These genes were obtained from previously isolated and characterized environmental Gram Negative bacterial strains described as nosocomial during 2007 and 2008.

The application of this molecular biology technique allowed the detection of at least, one of the four tetracycline resistance genes in all the bacterial strains, that phenotypically presented resistance to this antimicrobial in the Kirby Bauer method. In a high percentage of strains with intermediate susceptibility, as well in some tetracycline-sensitive strains, it was also detected at least one resistance gene.

The results of this study indicate that the detection of *tet* genes would complement the classical microbiology technique of the Kirby Bauer method that determinates the bacterial resistance to tetracyclines.

1.- INTRODUCCIÓN.

Las infecciones nosocomiales en medicina humana se han convertido en un problema relevante en salud pública y de gran trascendencia económica y social. Además, tienen importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad e inciden en los años de vida de la población afectada, a lo cual se suma el incremento en los días de hospitalización y los costos de atención.

La medicina veterinaria no está ajena a esta situación, cada vez se disminuye la brecha con la medicina humana en relación a las actividades desarrolladas, como técnicas invasivas, terapias antimicrobianas y días de hospitalización. Así, la aparición de las infecciones nosocomiales es cada día una preocupación creciente.

Estas infecciones –definidas como aquellas que son adquiridas dentro de un recinto hospitalario y cuya manifestación puede ocurrir 48-72 horas después del ingreso del paciente– pueden ser causadas por agentes biológicos como virus, parásitos y bacterias. Dentro de estas últimas, las multiresistentes han tomado el rol de mayor importancia.

El concepto de multiresistencia se refiere a la capacidad de una bacteria de desarrollar mecanismos de resistencia frente a dos o más antimicrobianos, lo que ha sido fomentado por la utilización incorrecta o inapropiada en la comunidad, ya sea por automedicación o por terapias empíricas, favoreciendo la aparición de cepas multiresistentes y por consiguiente, limitando la elección apropiada del antimicrobiano. De esta forma, el uso y abuso de los antimicrobianos ha ejercido una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas y como consecuencia, ha desencadenado un aumento de la resistencia antimicrobiana. Ello se ha convertido en un problema mundial al momento de establecer el tratamiento efectivo y no hay indicios de que vaya a disminuir, a menos que se tomen medidas necesarias de vigilancia y control.

Entre los antibióticos ampliamente usados en medicina veterinaria se encuentran las tetraciclinas, que si bien constituyen una familia de antibióticos de amplio espectro de acción y de utilidad en la práctica médica, han visto limitada su actividad por la presencia de

bacterias resistentes, que además son capaces de transmitir y adquirir genes de resistencia antimicrobiana de forma altamente eficaz.

El estudio de las infecciones nosocomiales, su etiología y la resistencia antimicrobiana puede ser abordado utilizando metodologías tanto de la microbiología clásica como de la biología molecular, herramientas que pueden contribuir a la obtención de antecedentes necesarios para el desarrollo de medidas de control y vigilancia, aplicables y eficaces, fundamentalmente frente a la existencia de bacterias multiresistentes.

Así, en esta Memoria de Título, se detectó la presencia de cuatro genes de resistencia a tetraciclinas: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(M)* y *tet(O)* en bacterias Gram negativas mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con la finalidad de aportar información en la definición de medidas de tratamiento y manejo más eficientes a seguir en los pacientes y en el ambiente hospitalario. Además, esta aplicación molecular puede ser de gran ayuda para complementar metodologías realizadas en la microbiología clásica, como el antibiograma por difusión de Kirby-Bauer.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Infecciones nosocomiales.

Las infecciones nosocomiales corresponden a aquellas infecciones que son adquiridas dentro de un recinto hospitalario y cuya manifestación, dependiendo del período de incubación de la infección, puede presentarse 48 o 72 horas después, o incluso una vez dado de alta el paciente (OMS, 2003). Las más frecuentes son las de heridas quirúrgicas, de vías urinarias y de vías respiratorias inferiores. En estudios de la OMS, se ha demostrado que la máxima prevalencia de infecciones nosocomiales ocurre en unidades de cuidados intensivos y en pabellones quirúrgicos de atención de enfermedades agudas. Así, la mayor frecuencia de infecciones se ha asociado a pacientes con mayor vulnerabilidad por causa de edad avanzada, enfermedad subyacente o quimioterapia (OMS, 2003).

Diversos agentes como bacterias comensales y patógenas, virus, parásitos y hongos pueden causar estas infecciones, siendo transmitidos a la comunidad por los pacientes después del alta hospitalaria, el personal de atención de salud y los visitantes. Su distribución varía entre diferentes poblaciones, países, establecimientos de salud (OMS, 2003).

2.2. Agentes bacterianos nosocomiales.

Las bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, causan una gran variedad de infecciones pulmonares, óseas, cardíacas y sanguíneas y a menudo, son resistentes o multiresistentes a los antibióticos al igual que *Staphylococcus coagulasa negativos*, que pueden causar infecciones en piel por catéteres intravasculares (OMS, 2003).

Los bacilos Gram negativos han desarrollado mecanismos de resistencia hacia la mayor parte de los antibióticos, lo cual ha obligado a modificar los esquemas de tratamiento en función de la resistencia bacteriana local de cada hospital (Leclercq, 2002).

Los patógenos Gram negativos multiresistentes -particularmente *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp. y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*- se han convertido en un importante problema en la medicina actual (Poole, 2004). *A. baumannii* y *P. aeruginosa* son patógenos Gram negativos cuyos pacientes objetivos son los inmunocomprometidos. Estos agentes expresan una variedad de determinantes que confieren resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos. En

general, sus mecanismos de resistencia son la disminución de la entrada a través de la membrana externa bacteriana, producción de enzimas modificadoras de antibiótico, eflujo activo y mutaciones del sitio blanco que reducen la afinidad de los antimicrobianos (Rice, 2006).

Es importante señalar que estos microorganismos resistentes coexisten con la flora habitual en piel o tracto gastrointestinal, siendo generalmente seleccionados como resultado de una presión antimicrobiana, llegando incluso a transformarse en la flora dominante (Ruiz *et al.*, 2007).

2.3. Situación epidemiológica de las infecciones nosocomiales.

El conocimiento de los microorganismos responsables de las infecciones nosocomiales permite dirigir la terapéutica y establecer políticas de uso de antibióticos y medidas de control basadas en los microorganismos predominantes (Ruiz *et al.*, 2007).

La problemática de las infecciones nosocomiales contribuyó al desarrollo de la epidemiología hospitalaria en las últimas tres décadas y a la creación de programas de control a nivel mundial. En América Latina sólo el 5% de los hospitales tienen comités con programas regulares de control (Ruiz *et al.*, 2007).

Según estudios epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias multiresistentes. También y más recientemente, se ha visto un interés marcado por evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia cruzada tanto para antisépticos y desinfectantes como para antibióticos (Cabrera *et al.*, 2007).

En los últimos años, el interés en la resistencia antimicrobiana en animales de compañía ha aumentado, lo que se explica en parte, por un incremento en el número de reportes de animales de compañía infectados y colonizados con organismos resistentes a múltiples drogas que son clínica y epidemiológicamente importantes. Aunque ha habido un reciente y modesto incremento en las publicaciones relativas a la resistencia antimicrobiana en animales de

compañía y bacterias zoonóticas, las investigaciones de la resistencia antimicrobiana se han centrado principalmente en humanos y alimentos de origen animal (Murphy *et al.*, 2009).

2.4. Resistencia bacteriana.

2.4.1. Desarrollo e importancia de la resistencia en las infecciones nosocomiales.

La participación de agentes bacterianos multiresistentes ha cobrado gran interés debido a un incremento de las infecciones producidas por bacterias resistentes a múltiples antibióticos, lo que ha constituido un importante desafío médico al momento de instaurar una terapia eficaz.

La resistencia a los antibióticos puede ser clasificada como intrínseca o adquirida. La primera es propia de algunas especies bacterianas resistentes a un antimicrobiano en forma natural, ya sea porque carecen de sitios blancos específicos sobre los que actúa ese fármaco, una baja afinidad a éstos, presencia de mecanismos de eflujo o impermeabilidad celular (Hoffman, 2001; Guardabassi y Courvalin, 2006). La resistencia adquirida puede originarse por cambios puntuales en el material genético (mutaciones) o por adquisición de genes de resistencia mediante tres mecanismos que permiten la transferencia de material genético entre bacterias: transformación, transducción y conjugación, siendo este último el más importante (Hoffman, 2001; Tenover, 2006).

Desde el punto de vista bacteriano, la introducción de antibióticos fue un enorme estímulo para la evolución. Como una reacción de supervivencia al estrés (presión de selección) las bacterias, por medio de su versatilidad bioquímica y genética se han adaptado a las condiciones del siglo XXI (Hamilton-Miller, 2004). La resistencia antimicrobiana podría ser explicada por la presión de selección ejercida debido al uso y abuso de antimicrobianos, como en el caso de las tetraciclinas, dando lugar a la aparición de cepas resistentes (Chopra y Roberts, 2001).

Bajo la presión selectiva de los antimicrobianos, las bacterias tienen la capacidad para desarrollar e intercambiar genes de resistencia lo que las hace resistentes a las sustancias antimicrobianas utilizadas (Perreten *et al.*, 2005). Al respecto, los antibióticos se han descubierto como sustancias que pueden inhibir el crecimiento de patógenos microbianos, y en otras ocasiones juegan este rol en ambientes naturales. Ahora, casi cualquier compuesto puede ser tóxico cuando está a una concentración lo suficientemente alta, y ya que las concentraciones de antibióticos usadas para la terapia pueden ser más altas que las

encontradas en ambientes naturales, puede resultar que al igual que otros compuestos tóxicos, éstos tengan un efecto hormético, el cual se explica como la propiedad de un compuesto que tiene la característica de ser beneficioso a bajas concentraciones y tóxico en altas concentraciones. En bajas concentraciones los antibióticos pueden desencadenar la expresión de un determinado conjunto de genes que pueden ser beneficiosos para las bacterias. Sin embargo, a mayores concentraciones se induce la respuesta de estrés necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano (Martínez *et al.*, 2008).

Dado que estos compuestos inhiben el crecimiento bacteriano, se pensó que debían ser producidos por los microorganismos del suelo para inhibir el crecimiento de los competidores en los hábitats naturales. Sin embargo, se ha demostrado que los antibióticos modulan la transcripción de las bacterias en función de la dosis. Además, cada antibiótico desencadena respuestas específicas y cada una de éstas tiene un valor adaptativo. Desde esta idea, se ha planteado que los antibióticos, además de inhibidores, pueden servir como moléculas señales a las bajas concentraciones en las cuales se encuentran usualmente en ambientes naturales (Davies, 2006; Fajardo y Martínez, 2008; Yim *et al.*, 2006).

Las bacterias comensales representan un reservorio de genes de resistencia a antibióticos que tienen el potencial de ser transferidos a patógenos humanos y animales. En relación a este tema, en Europa se han hecho esfuerzos para reducir la aparición y propagación de las bacterias resistentes como ha quedado expresado en el Informe Swann, realizado en el Reino Unido. En este informe se hizo notar una alta preocupación por el uso de antibióticos como agentes terapéuticos y como promotores de crecimiento que podrían llevar a un aumento de la resistencia en bacterias de origen humano y animal. De esta manera, se implementaron programas de vigilancia de bacterias resistentes a antibióticos entre aislados humanos y animales, y ya en el año 2006, las sustancias antimicrobianas para propósitos no terapéuticos en la cría de animales fueron retiradas (Butaye *et al.*, 2003b; Perreten *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2010).

Actualmente, una bacteria se considera resistente cuando las concentraciones de un antimicrobiano necesarias para inhibir el crecimiento de una bacteria *in vitro*, son mayores

que las concentraciones alcanzadas en suero o en tejidos, medidos por la concentración mínima inhibitoria (Sussmann *et al.*, 2004).

2.4.1.1. Factores que contribuyen al desarrollo de resistencia. los factores contribuyentes son variados, entre los que destacan:

- Medidas ineficientes para el control de infecciones en los centros hospitalarios.
- Falta de campañas educativas en el uso y manejo de los medicamentos, debido a las condiciones de pobreza e ignorancia en las prescripciones.
- Severidad de las enfermedades y el manejo de pacientes en las unidades de cuidado intensivo.
- Colonización previa por microorganismos con resistencias múltiples.
- Procedimientos invasivos como cateterización y diálisis.
- Uso de antibióticos en agricultura y acuicultura, pues ocasiona la presencia de residuos en la carne de los animales y la selección de bacterias resistentes en los intestinos de los animales de consumo humano. Además, se pueden encontrar cepas bacterianas resistentes en los alimentos de origen vegetal cuando se irrigan con aguas residuales o cuando se aplican antibióticos a los cultivos.

Al respecto, los alimentos de origen animal contaminados son una fuente de infecciones bacterianas en humanos. Por lo tanto, la presencia de cepas resistentes a antibióticos en animales de consumo –como las aves de corral- ha planteado una alta preocupación respecto a que el tratamiento de estas infecciones en humanos no sea eficaz. Lo anterior se explicaría por la existencia de especies bacterianas que se vuelven resistentes cuando los antibióticos son administrados a estas aves durante un largo período, sobretodo en bajas dosis (Kilonzo-Nthenge *et al.*, 2008).

- Factores del medio: la presencia de bacterias resistentes en nacimientos de agua se ha documentado en varias partes del mundo. La resistencia se puede deber a la producción natural de antibióticos por bacterias del suelo, que actúan como reservorios naturales de genes de resistencia transferibles.
- Uso de elementos para limpieza casera, se ha incrementado de una forma importante en los últimos años. Las sustancias antibacterianas añadidas a estos elementos son semejantes a los antibióticos en su acción y pueden favorecer el desarrollo de resistencia en ciertas cepas (Cabrera *et al.*, 2007).

2.4.2. Mecanismos de transferencia de ADN y elementos genéticos participantes.

Durante la división celular de una bacteria resistente, los genes de resistencia por lo general, se transferirán a las células hijas incluso si se encuentran en cromosomas o en elementos genéticos móviles, lo cual constituye la transferencia vertical de resistencia. Por otra parte, cuando los genes de resistencia se encuentran en elementos móviles como plasmidios, transposones o integrones y cassetes génicos, la transferencia de esos elementos desde una bacteria a otra dará lugar a una amplia distribución de los genes incluso entre especies o géneros distintos, dando origen a la transferencia horizontal (Butaye *et al.*, 2003a).

La transferencia de genes entre organismos dentro del mismo género es común; sin embargo, también ha sido observada entre géneros muy distintos incluyendo la transferencia entre microorganismos evolutivamente distantes como las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (Courvalin, 1994).

Un estudio realizado en el Reino Unido, determinó la tasa de transferencia de resistencia antibiótica entre miembros comensales y patogénicos del grupo *Enterobacteriaceae* en íleo de porcino *in vitro*, demostrando que el material genético que confiere resistencia es absolutamente transmisible entre cepas transitorias o comensales de *E.coli* y *Salmonella* spp. Claramente, los miembros de este grupo de bacterias fueron capaces de intercambiar genes dentro de la microflora intestinal de cerdo aumentando el riesgo de una posible falla en la terapia veterinaria. De mayor preocupación es la difusión de genes de resistencia hacia y desde patógenos zoonóticos, incrementando el riesgo de contaminación de la cadena alimentaria por bacterias multiresistentes nocivas para el hombre (Blake *et al.*, 2003).

La resistencia basada en plásmidos transmisibles confiere a los microorganismos ventajas significativas explicadas en lo siguiente (Koch, 1981):

- La resistencia a varios antimicrobianos puede ser reunida en plásmidos únicos.
- Los genes de resistencia a antibióticos pueden ser o no traducidos cuando sea necesario.
- Los plásmidos se pueden almacenar en una parte mínima de la población microbiana y ser recuperados si es necesario.
- Los plásmidos pueden servir como vectores para transferencia de genes.
- Los plásmidos tienen un rol evolutivo en el reordenamiento de las estructuras genéticas tanto entre como dentro de organismos.

Dependiendo de la bacteria y de los elementos móviles implicados, la transferencia horizontal de genes puede ocurrir vía transformación, transducción y conjugación, siendo esta última la forma de transferencia más común (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

La transformación consiste en la incorporación a una bacteria de ADN libre presente en el medio externo, procedente de la lisis de otras bacterias. Una vez dentro de la bacteria receptora, el ADN ha de integrarse en el cromosoma receptor, replicándose y expresándose con éste (Ruiz-Bravo *et al.*, 2003).

La transducción es la transferencia de ADN cromosómico o plasmidial de una bacteria a otra, utilizando un bacteriófago que replica dentro de las células bacterianas hasta lisar la célula o integrarse en el genoma sin producir la muerte (Ruiz-Bravo *et al.*, 2003).

La conjugación consiste en el intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptora) mediante contacto físico entre ambas. En bacterias Gram negativas la unión entre donante y receptor se efectúa mediante los pili conjugativos que posee el donante (Ruiz-Bravo *et al.*, 2003). La conjugación requiere de elementos genéticos replicativos llamados plasmidios conjugativos, los cuales incluyen transposones conjugativos. Estos elementos genéticos codifican proteínas que facilitan su propia transferencia y la del ADN celular desde la célula donadora que lleva el plásmido, a una célula receptora que carece del plasmidio o de elementos conjugativos integrados. Mientras en bacterias Gram positivas los plasmidios y los transposones no usan pili (Frost *et al.*, 2005), en bacterias Gram negativas los sistemas conjugativos tienen tres componentes esenciales: el transferosoma, que está formado por la envoltura celular y es responsable de la síntesis del pili de conjugación; el relaxosoma, el cual es un complejo de proteínas que procesan el ADN, y finalmente, la proteína de acoplamiento, que conecta las otras dos entidades entre sí (Lawley *et al.*, 2004).

La transferencia de ADN entre bacterias, resulta ser un punto crítico para la diseminación de la resistencia y los plasmidios han demostrado ser el vehículo ideal para la difusión de los genes involucrados. Éstos existían mucho antes que el hombre utilizara antibacterianos y raramente llevaban consigo factores de resistencia. Adicionalmente, estos genes son también

parte de transposones, los cuales son transmitidos entre distintas especies bacterianas (Livermore, 2003).

Al respecto, existen varias evidencias concretas de que los plasmidios son el vehículo principal, y por ello, están involucrados también en brotes secuenciales de distintas bacterias resistentes a múltiples drogas como *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacter cloacae* en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), demostrando que tanto clones de dichas especies como de Enterobacterias pueden albergar plasmidios similares (Al Naiemi *et al.*, 2005).

Algunos transposones son directamente transmisibles entre bacterias, pero no exclusivamente entre especies Gram positivas. Los genes de resistencia también pueden ser transmitidos por bacteriófagos lisogénicos. También existen los integrones, elementos genéticos capaces de capturar cassettes de genes desde el medio ambiente e incorporarlos a ellos mismos por recombinación sitio específica (Miko *et al.*, 2005).

La propagación de los genes de resistencia es mucho mayor cuando forman parte de un cassette móvil de genes, lo cual, fomenta la transferencia horizontal. Es más, y aún cuando, los antibióticos dejan de ser usados, los genes que codifican resistencia a éstos no necesariamente se pierden. De hecho, si son expuestos nuevamente al agente, los integrones pueden mostrar una forma de memoria genética en la cual los cassettes de genes son reposicionados cerca del promotor por la integrasa del integrón, para luego expresarse de manera más eficiente (Collis y Hall, 1995; White *et al.*, 2001).

Los integrones son sistemas que facilitan la adquisición y expresión de determinantes de resistencia tras un promotor simple y que se encuentran ampliamente distribuidos entre bacterias Gram negativas y pueden ubicarse dentro de los plasmidios (Livermore, 2003). Éstos, fueron identificados en virtud de su importante papel en la propagación de genes de resistencia a los antibióticos. Hasta el momento, cinco clases de integrones móviles tienen un papel en la difusión de la resistencia, pero tres de ellas son las más importantes en el fenotipo de resistencia múltiple, siendo definidas basadas en la secuencia que codifica la integrasa que forma parte de este elemento y que muestran entre un 40-58% de identidad (Mazel, 2006).

Actualmente, la comprensión de su importancia en la evolución del genoma bacteriano se ha ampliado con el descubrimiento de estructuras más grandes denominadas superintegrones, los

cuales contienen cientos de genes accesorios que codificarían tanto proteínas para la resistencia a antibióticos como aquellas involucradas en funciones adaptativas y constituyen una fracción importante del genoma de muchas especies bacterianas (Mazel, 2006).

En un estudio realizado en bacterias Gram negativas aisladas desde animales de un zoológico en Japón, se demostró que éstos constituyen un reservorio potencial de bacterias resistentes a antimicrobianos y de genes de resistencia clínicamente importantes (Ahmed *et al.*, 2007).

La familia *Enterobacteriaceae* contiene géneros que habitan el tracto intestinal de humanos y animales, y que son tanto patógenos como comensales multiresistentes. Debido a que muchas especies de esta familia conviven en el tracto intestinal y se exponen con frecuencia a diversos antibióticos, existe la posibilidad de la difusión de los genes de resistencia. Por lo tanto, la presencia de integrones en especies bacterianas de esta familia, es de interés con respecto al creciente dilema de la resistencia antimicrobiana (Goldstein *et al.*, 2001).

Hasta ahora, han sido identificados los cassettes de genes que confieren resistencia a casi todas las clases importantes de antibióticos. En un estudio realizado en Australia, se detectaron integrones en un 49% de 120 aislados urinarios de la familia *Enterobacteriaceae* mediante PCR. El actual impacto de los integrones en Australia y en otros países, parece estar enfocado a los antibióticos más antiguos como Estreptomina, Trimetropim, Sulfafurazol y los aminoglicósidos más recientes. Sin embargo, los genes que confieren resistencia a antimicrobianos de reciente introducción ya forman parte de los cassettes. Estos cassettes presumiblemente aún no han recibido suficiente presión selectiva o no han tenido tiempo necesario para fomentar su difusión generalizada (White *et al.*, 2001).

2.4.3. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Se describen cuatro mecanismos principales:

- **Destrucción e inactivación de la droga o antimicrobiano.**
- **Modificación o alteración del sitio blanco o molécula objetivo.**
- **Exclusión intrínseca.**
- **Eflujo activo de la droga.**

Destrucción e inactivación de la droga.

Este mecanismo contempla enzimas que degradan y destruyen el agente antimicrobiano, como las betalactamasas que degradan la estructura química del anillo betalactámico con acción sobre penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemes. Otras enzimas, modifican la estructura de los antimicrobianos inactivando los anfenicoles como el cloranfenicol y los aminoglucósidos como la estreptomycinina y la gentamicina. Algunos de los genes que codifican betalactamasas son fácilmente transmisibles entre especies bacterianas (Levy y Marshall, 2004).

Modificación o alteración del sitio blanco o molécula blanco.

Cambio estructural del sitio blanco del fármaco de manera que ya no puede ser afectado por la droga (Guardabassi y Courvalin, 2006).

Exclusión intrínseca o barreras de permeabilidad.

Involucra la presencia de una barrera de permeabilidad reducida que evita la entrada del compuesto activo a la célula bacteriana. En bacterias Gram negativas las drogas hidrofílicas entran a la célula a través de porinas y las drogas hidrofóbicas difunden a través de la capa fosfolipídica. La membrana externa de algunas bacterias, como la de *Pseudomonas aeruginosa*, es menos permeable que en otras especies, lo que le confiere a estos microorganismos bajos niveles de susceptibilidad antimicrobiana. Por otro lado, pueden existir mutaciones que conducen a la pérdida, reducción del tamaño o de expresión de porinas y cuyo efecto ha demostrado otorgar resistencia a varios agentes (Guardabassi y Courvalin, 2006).

El mecanismo de Exclusión Intrínseca o de barreras de permeabilidad es clínicamente importante en la resistencia a betalactámicos y fluoroquinolonas en bacterias Gram negativas, especialmente en *Pseudomonas aeruginosa* y en *Enterobacteriaceae*, y generalmente, confiere bajos niveles de resistencia, pero contribuye al fenotipo resistente de las cepas clínicas multiresistentes en asociación con otros mecanismos. Otro ejemplo claro, es la lipofilidad de la pared celular del género *Mycobacterium*, cuya característica le permite actuar como mecanismo de resistencia para muchos antimicrobianos (Guardabassi y Courvalin, 2006; Jenkinson, 1996).

Eflujo activo de la droga.

Este mecanismo puede ser considerado un tipo exclusión intrínseca, en el que la molécula que inicialmente ingresa a la célula bacteriana a través de la membrana celular, es transportada de vuelta al medio extracelular mediante un mecanismo dependiente de energía, el cual, puede ser visto en bacterias, células eucariotas y protozoos para expulsar metabolitos o componentes tóxicos, incluyendo drogas. Las proteínas de transmembrana conocidas como bombas de eflujo o transportadores activos son los elementos que participan en el eflujo activo.

Las proteínas tienen una amplia especificidad de sustrato y sólo algunas de ellas confieren resistencia a antimicrobianos. Así, la resistencia es determinada por la reducción en la concentración de la droga en el citoplasma, previniendo o limitando el acceso de la droga a su sitio objetivo (Guardabassi y Courvalin, 2006).

2.5. Bacterias Gram Negativas: implicancias de su presencia y del fenómeno de multiresistencia.

Las infecciones por bacterias Gram negativas son muy prevalentes en pacientes hospitalizados, especialmente en las unidades de cuidados intensivos y la multiresistencia presenta un reto terapéutico que deja pocas posibilidades para el tratamiento de estas infecciones, pues los mecanismos que utilizan las bacterias para defenderse de los antibióticos están en constante evolución (Tafur *et al.*, 2008).

Su estructura de pared, junto a la naturaleza de los mecanismos de resistencia son objetos de estudios atractivos para el desarrollo de nuevas drogas antimicrobianas y vacunas (Bos y Tommassen, 2004).

2.6. Tetraciclinas: antimicrobianos de reducida efectividad.

Entre los antimicrobianos que han visto disminuida su acción, se encuentran las tetraciclinas, que corresponden a una familia de antibióticos descubierta en 1948 y cuyo mecanismo de acción involucra la inhibición de la síntesis proteica impidiendo la unión del aminoacyl-tRNA al sitio aceptor (A) del ribosoma. Poseen un amplio espectro de acción, exhibiendo actividad contra una amplia gama de bacterias Gram (-) y Gram (+), contra microorganismos como clamidias, micoplasmas, rickettsias y contra parásitos protozoarios. Así, la clortetraciclina y la oxitetraciclina, productos de *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus*,

respectivamente, fueron los primeros miembros del grupo de las tetraciclinas en ser descritos. Otras tetraciclinas se identificaron más tarde, como la tetraciclina, producida naturalmente a partir de *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus* y *Streptomyces viridofaciens*, la dimetilclortetraciclina a partir de *Streptomyces aureofaciens* o algunos productos semisintéticos como metaciclina, doxiciclina o minociclina (Chopra y Roberts, 2001).

A pesar del éxito de las primeras tetraciclinas, se han buscado análogos con mejor solubilidad en agua, ya sea para permitir una administración parenteral o para mejorar la absorción oral, siendo las más recientemente descritas del grupo semisintético, denominadas glicilciclinas (Chopra y Roberts, 2001).

Las propiedades antimicrobianas de estos agentes y la ausencia de efectos secundarios adversos han llevado a su amplia utilización en la terapia de infecciones humanas y animales, además de ser utilizadas profilácticamente para la prevención de la malaria causada por *Plasmodium falciparum* resistente a mefloquina (Chopra y Roberts, 2001).

2.6.1. Mecanismo de acción de las Tetraciclinas.

Para llegar a su sitio blanco, esta molécula necesita atravesar los distintos sistemas de membranas dependiendo del tipo de bacterias. En el caso de las bacterias Gram (-) las tetraciclinas atraviesan la membrana externa por difusión pasiva a través de porinas (OmpF y OmpC), en forma de complejo molecular en donde la tetraciclina se une a un catión cargado positivamente, generalmente de tipo magnesio. Este complejo es disociado en el espacio periplásmico, volviéndose la tetraciclina una molécula electroneutral débilmente lipofílica, lo cual le permite atravesar la membrana citoplasmática, siendo necesario un mecanismo dependiente de energía, correspondiente a la fuerza protón motriz, capaz de introducir la molécula de tetraciclina al citoplasma (Chopra y Roberts, 2001; Michalova *et al.*, 2004).

Diversos estudios indican un sitio único de unión de alta afinidad para las tetraciclinas en la subunidad ribosomal 30s, uniéndose directamente a la proteína S7 y a bases de la subunidad 16S del rRNA como G693, A892, U1052, C1050, G1300 y G1138 que contribuyen en esta función (Chopra y Roberts, 2001). De esta manera, las tetraciclinas inhiben la localización del aminoacyl- tRNA-aa dentro del sitio ribosomal A y, por lo tanto, previenen la adición de nuevos aminoácidos al polipéptido en crecimiento (Roberts, 2005).

2.6.2. Resistencia bacteriana a las Tetraciclinas.

La amplia variedad de aplicaciones de las tetraciclinas ha llevado a la propagación de cepas resistentes de bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo tanto cepas patógenas como no patógenas. Las bacterias no patógenas podrían actuar como un reservorio de determinantes de resistencia, los que pueden ser difundidos por la transferencia horizontal de los agentes patógenos. La efectiva propagación horizontal se ve favorecida por la localización de genes de resistencia a tetraciclinas en elementos genéticos móviles. Su intercambio, reforzado por el uso de las tetraciclinas, es observado tanto en bacterias del mismo género y especie, como entre especies y géneros diferentes (Michalova *et al.*, 2004).

2.6.3. Mecanismos de resistencia a Tetraciclinas.

Aunque las tetraciclinas mantienen un importante papel en la medicina humana y veterinaria, la emergencia de la resistencia microbiana ha limitado su efectividad. En 1953, se aisló la primera bacteria resistente a tetraciclina: *Shigella dysenteriae* y sólo dos años más tarde se aisló la primera *Shigella* resistente a múltiples antimicrobianos: tetraciclinas, estreptomicina y cloranfenicol (Roberts, 2003). Así, los principales mecanismos de resistencia asociados descritos para contrarrestar el efecto de las tetraciclinas son: bombas de expulsión activa específicas para tetraciclinas y proteínas de protección ribosomal, siendo de menor importancia la inactivación enzimática del fármaco (Trieber y Taylor, 2002). El primer mecanismo aparece como el más descrito entre bacterias Gram (-), mientras que el segundo lo ha sido entre las bacterias Gram (+).

En la actualidad, se han descrito a lo menos 43 genes relacionados con los mecanismos de resistencia a tetraciclinas: tres genes (denominados *otr*) asociados con la resistencia para oxitetraciclinas y 40 (39 denominados *tet* y uno *tcr*) con mecanismos de resistencia para tetraciclinas (Roberts, 2005; Roberts, 2008). La rápida diseminación de resistencia a tetraciclinas se ha asociado a la localización de los denominados genes *tet* en plasmidios, transposones e integrones (Bryan *et al.*, 2004).

Entre los genes *tet* se han descrito 12 clases que codifican proteínas de protección ribosomal. El más frecuentemente detectado es *tet(M)*, lo que se explicaría porque este gen se encuentra formando parte de un transposón conjugativo (cuadro 1). Paralelamente, 27 genes codifican bombas de eflujo activo (cuadro 1). Además, existen tres genes que codifican mecanismos de

inactivación enzimática y un gen que se desconoce su acción (cuadro 1) (Villedieu *et al.*, 2003; Roberts, 2005; Roberts, 2008).

Es importante señalar que el gen *tet(M)*, además, está ampliamente distribuido entre las bacterias Gram (+), destacando su presencia por sobre otros. Por su parte, en bacterias Gram (-) se han descrito genes como *tet(A)*, *tet(E)*, *tet(G)* y *tet(H)* con mayor frecuencia. Sin embargo, el primero de ellos, *tet(A)*, junto con los genes *tet(B)*, *tet(M)* y *tet(O)*, son los que se han caracterizado de mejor forma y se han encontrado con mayor distribución tomando un papel de relevancia en otorgar resistencia a las tetraciclinas (Trzcinski *et al.*, 2000; Bryan *et al.*, 2004; Martí *et al.*, 2006) (Cuadro 1).

Cuadro 1

Mecanismos de resistencia caracterizados para los genes <i>tet</i> y <i>otr</i>.			
Eflujo Activo	Protección Ribosomal	Inactivación Enzimática	Mecanismo Desconocido
<i>tet(A); tet(B); tet(C); tet(D)</i> <i>tet(E); tet(G); tet(H); tet(J)</i> <i>tet(V); tet(Y); tet(Z); tet(30)</i> <i>tet(31); tet(33); tet(35); tet(39)</i> <i>tet(41); tet(K); tet(L); tet(38);</i> <i>tetA(P); tet(40); otr(B); otr(C)</i> <i>tcr; tet(42); tet(43)</i>	<i>tet(M); tet(O)</i> <i>tet(S); tet(W)</i> <i>tet(32); tet(Q)</i> <i>tet(T); tet(36)</i> <i>otr(A); tetB(P)</i> <i>tet; tet(44)</i>	<i>tet(X)</i> <i>tet(37)</i> <i>tet(34)</i>	<i>tet(U)</i>

2.6.3.1. Mecanismo de Expulsión Activa.

Las bombas de eflujo se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de la bacteria una gran cantidad de moléculas, entre ellas, metabolitos, nutrientes (azúcares, aminoácidos, sales), detergentes y antibióticos (Mahamoud *et al.*, 2007). Para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra- transporte iónico como sustrato energético. El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula (Tafur *et al.*, 2008). Dicho de otra forma, la sobreexpresión de una o más de estas bombas impide la acumulación intracelular del agente a los umbrales necesarios para su actividad inhibitoria (Levy, 2002). Esta superproducción,

generalmente se acompaña por un aumento en la resistencia a dos o más antibióticos estructuralmente no relacionados o multidrogaresistencia, lo que contribuye significativamente a la aparición y propagación de los agentes patógenos (Mahamoud *et al.*, 2007). En las bacterias se ha demostrado que además de ofrecer resistencia a los antibióticos y otros compuestos tóxicos, las bombas contribuyen a la virulencia de las bacterias (Aendekerk *et al.*, 2005; Piddock, 2006a, b). Sumado a esto, pueden conferir resistencia a las sustancias naturales producidas por el hospedero incluyendo, la bilis, las hormonas y las moléculas de defensa de este último. Se ha visto, que algunas bombas de la familia RND (Resistance Nodulation Division) tienen un papel en la colonización y persistencia de bacterias en su hospedador (Piddock, 2006a).

Las bombas de salida pueden ser específicas para un fármaco (generalmente codificadas por un plasmidio y, por lo tanto, transmisibles) o inespecíficas (habitualmente expresadas en el cromosoma bacteriano). Si se aumenta la expresión de una bomba inespecífica, puede generarse resistencia cruzada a múltiples clases de fármacos empleándose un sólo mecanismo (Depardieu *et al.*, 2007). Según la clasificación, un primer grupo incluye las proteínas codificadas por los genes de las clases A, B, C, D, E, G, H, J, Z y *tet(30)*. Esas proteínas de eflujo consisten de 12 dominios de transmembrana. Los genes estructurales *tet* respectivos están acompañados por un gen *tet* represor específico. La expresión de estos genes *tet* es inducible por cantidades nanomolares de tetraciclinas (Butaye *et al.*, 2003a). La inducción está basada en la unión del complejo tetraciclina Mg^{+2} a la proteína represora codificada por un gen *tet*, el cual, en ausencia de tetraciclina, bloquea la transcripción del gen estructural. Los genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)* y *tet(E)* están ampliamente distribuidos entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias como *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Vibrio* (Chopra y Roberts, 2001). Un segundo grupo comprende los genes *tet(K)* y *tet(L)*, los que son principalmente encontrados en *Staphylococcus*, *Streptococcus* y otros géneros Gram positivos y cuyas proteínas de eflujo codificadas, consisten de 14 dominios de transmembrana. Su expresión es también inducible por las tetraciclinas (Butaye *et al.*, 2003a; Roberts, 2005).

2.6.3.2. Mecanismo de protección ribosomal.

Este mecanismo fue descrito por primera vez en estreptococos (Burdett, 1986). Las proteínas codificadas en estos genes interactúan con proteínas ubicadas dentro del ribosoma, causando

un cambio conformacional del sitio primario de unión de las tetraciclinas y promoviendo su liberación desde el ribosoma. Con ésto, el ribosoma retorna a su estado conformacional estándar y la síntesis de proteínas prosigue (Roberts, 2005).

2.6.3.3. Familias de bombas de eflujo y su efecto sobre la acción de las Tetraciclinas.

Los mecanismos de eflujo que dan cuenta de la resistencia a una gran variedad de agentes antimicrobianos se encuentran en una amplia gama de bacterias. El mecanismo de expulsión activa consiste en la utilización de un sistema de bomba de eflujo, compuesto por proteínas pertenecientes a distintas familias transportadoras. Las proteínas de eflujo son las mejor estudiadas de las proteínas *tet*. El mecanismo más descrito se explica porque las proteínas de eflujo, intercambian un protón por un complejo tetraciclina – catión contra un gradiente de concentración y está clasificado en la superfamilia MFS (Major Facility Superfamily). De esa manera, con la tetraciclina exportada, se reduce la concentración de droga intracelular y se disminuye drásticamente su unión al ribosoma dentro de la célula (Chopra y Roberts, 2001; Vila *et al.*, 2007).

Cabe señalar, que los dos mecanismos importantes señalados, han sido descritos simultáneamente en una misma bacteria como en el caso de *Acinetobacter baumannii*. Por una parte, la presencia del mecanismo de eflujo activo resulta de la adquisición de genes plasmidiales (en su mayoría conjugativos): *tet(A)* y *tet(B)*, mientras que los genes que codifican para el mecanismo de protección ribosomal estarían representados por el gen *tet(M)*, que comúnmente es encontrado dentro de transposones conjugativos (Chopra y Roberts, 2001; Roberts, 2005). *A.baumannii* es considerada una de las bacterias multiresistentes características causantes de infecciones nosocomiales y tanto la resistencia adquirida como la intrínseca pueden contribuir a su multiresistencia (Vila *et al.*, 2007).

Nuevos reportes han demostrado bombas de eflujo de la familia RND involucrados en la disminución de la susceptibilidad a tigeciclina. Además, por técnicas de biología molecular se ha encontrado que durante la exposición *in vitro* a tigeciclina, los aislamientos de *A. baumannii* pueden aumentar la expresión de hasta 54 veces esta bomba (Peleg *et al.*, 2007). Usualmente, las bombas de salida causan pequeños aumentos en la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM); sin embargo, cuando aparecen simultáneamente varios mecanismos de resistencia, se produce una resistencia clínicamente evidente. De esta manera, las bombas de eflujo, el cierre de las porinas, las mutaciones en los sitios de acción y las enzimas hidrolíticas

trabajan armónicamente para defender a la bacteria de los antibióticos y, por lo tanto, de su muerte (Tafur *et al.*, 2008).

2.7. Vigilancia epidemiológica de la resistencia bacteriana.

2.7.1. Microbiología clásica.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son una práctica común en el laboratorio de microbiología. De hecho, las decisiones terapéuticas ligadas a estos métodos son de preferencia basadas en la detección de la sensibilidad manifiesta de un grupo de microorganismos a la exposición de un antimicrobiano en particular. Éstas, se realizan con el método de difusión en agar y el método de microdilución en caldo. El primero, indica el patrón de resistencia o sensibilidad *in vitro* de un organismo ante un panel de antimicrobianos, mientras que el segundo, proporciona una medida cuantitativa de la CMI, definida como la menor concentración del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un organismo (Barenfanger *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2006).

Una función básica de todos los laboratorios de bacteriología es determinar la susceptibilidad antibiótica de las bacterias aisladas, es decir, detectar el fenotipo de resistencia conferido por los genes de resistencia (Woodford y Sundsfjord, 2005). También, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, pueden descubrir un patrón único de resistencia antimicrobiana, que sirve a menudo como alerta temprana de problemas potenciales de enfermedad entre los pacientes (Singh *et al.*, 2006).

Sin embargo, la incorporación de métodos moleculares es una de las directrices para el control de infecciones hospitalarias y son médicamente útiles y económicamente justificables. Por esto, las técnicas de amplificación de genes son cada vez más usadas en el diagnóstico en microbiología. Los estudios que comparan los métodos clásicos con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han realizado para antibióticos y microorganismos específicos, entre éstos: la detección de resistencia a quinolonas; los problemas causados por múltiples genes que llevan el mismo fenotipo de resistencia, como en el caso de la detección de resistencia a aminoglicósidos; la detección de resistencia a antibióticos en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, que demuestran el valor potencial de la amplificación de genes en organismos de lento crecimiento, y la detección de resistencia a vancomicina en *Enterococcus* que demuestra la importancia en el control de la creciente resistencia a

antibióticos (Visser y Fluit, 1995). En un estudio se encontró que la detección por PCR versus métodos de cultivo estándar, redujo el tiempo de identificación de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) en pacientes de unidades de cuidados intensivos de 106 a 23 horas y en pacientes quirúrgicos de 87 a 21 horas (Harbarth *et al.*, 2006).

2.7.2. Microbiología molecular.

La investigación y el control de las infecciones nosocomiales es un complejo problema que involucra la clínica, el control de la infección y al personal del laboratorio. Los esfuerzos, tanto del microbiólogo como del epidemiólogo del hospital, se facilitan en gran medida por la disponibilidad de las nuevas técnicas moleculares de tipificación, las que han sido utilizadas con éxito en la investigación y el control de patógenos comunes y emergentes nosocomiales. La habilidad para caracterizar con rapidez y sin ambigüedad organismos sospechosos de causar un brote de una enfermedad, es fundamental para la salud pública y los esfuerzos en el control de la infección de un hospital. Muchos brotes de infecciones, han sido investigados por técnicas moleculares y además se han utilizado para detectar directamente genes de resistencia o mutaciones que dan lugar a la resistencia en los organismos. El poder definir las mutaciones responsables de la resistencia microbiana a los agentes, ha dado lugar a nuevos métodos para vigilar la eficacia de la terapia antimicrobiana (Tang *et al.*, 1997).

Cada vez más, las infecciones nosocomiales con patógenos multiresistentes representan un problema importante en los pacientes. Muchos factores de riesgo para la adquisición de una infección han sido estudiados, incluyendo la presencia de enfermedades subyacentes (por ejemplo: diabetes, insuficiencia renal o tumores), prolongadas hospitalizaciones, procedimientos quirúrgicos, recepción de una terapia antimicrobiana previa y la presencia de catéteres intravenosos. Comprender la distribución de los patógenos y su relación fenotípica y genotípica es esencial para determinar la epidemiología de las infecciones nosocomiales y ayudar en el diseño de métodos de control de patógenos. El enfoque ha empezado a cambiar en las últimas dos décadas con el desarrollo e implementación de nuevas tecnologías basadas en el DNA o análisis molecular. No menos importante, es que muchas de las especies que son las principales causas de infecciones adquiridas en el hospital también son organismos comensales (Singh *et al.*, 2006).

En la actualidad, si bien el médico clínico, utiliza las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, éstas requieren a lo menos 48 horas para obtener el resultado. Para aumentar la rapidez y precisión de las pruebas de susceptibilidad se han desarrollado numerosas técnicas basadas en el DNA para la detección de resistencia bacteriana (Bergeron y Ouellette, 1998).

2.7.2.1. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Actualmente, la aplicación de métodos moleculares que ayuden a establecer la relación clonal de los aislamientos y la caracterización de los mecanismos de resistencia implicados y de los elementos genéticos, son de gran utilidad para contribuir al diseño de programas de control y vigilancia. Además, las técnicas moleculares han demostrado ser propicias y adecuadas para estudiar la propagación de bacterias resistentes o de genes de resistencia a través de diferentes nichos ecológicos, como es el caso del estudio de la propagación de genes como el *tet*, *floR*, *mefA* o *msrA* que codifican para transportadores específicos (Butaye *et al.*, 2003a). Uno de estos métodos moleculares es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que básicamente consiste en la síntesis *in vitro* de una secuencia específica de ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante el uso de partidores o *primers* (secuencias de oligonucleótidos altamente específicas y complementarias) que reconocen secuencias que flanquean el segmento de ADN a amplificar. Ésto se realiza mediante el uso de la *Taq* polimerasa termoestable, enzima que proviene de la bacteria *Thermophilus aquaticus*, capaz de añadir los desoxinucleótidos libres al extremo 3' del partidor, generando copias en forma exponencial de una secuencia determinada, a temperaturas elevadas y durante lapsos cortos de tiempo. En estas condiciones, se logra significativamente un aumento en la especificidad, sensibilidad y rendimiento de los productos amplificados (Mullis y Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988).

Esta metodología se basa en el proceso fundamental de replicación del ADN que ocurre en cada célula viva, por lo que es básicamente una adaptación *in vitro* del proceso de copia del ADN *in vivo*. Debido a que la PCR es tan eficiente en amplificar, incluso cantidades en picogramos de ADN, la contaminación con pequeñas cantidades de ácidos nucleicos puede conducir a la generación de secuencias no deseadas y además, a resultantes falsos positivos (Lo y Feldman, 1994).

Varias investigaciones exitosas se han llevado cabo, tanto para mecanismos de resistencia bacteriana como para resistencia viral. En este sentido, las técnicas moleculares han jugado un papel importante en la investigación y control de patógenos nosocomiales y en la detección de genes de resistencia (Tang *et al.*, 1997).

Por su parte, la detección de genes de resistencia que dan origen a los diferentes mecanismos que contrarrestan la acción de antimicrobianos en bacterias, ha resultado una alternativa valiosa. El uso de una técnica de biología molecular como el PCR, es una herramienta eficaz en su búsqueda, y guarda un relevante antecedente para establecer relaciones con el método de Kirby-Bauer de la microbiología clásica, que nos señala información respecto al perfil de resistencia de una cepa bacteriana definida.

En Chile, en el ámbito de medicina veterinaria, no existen antecedentes publicados respecto a los genes de resistencia en bacterias nosocomiales, más aún, con la particularidad de otorgar multiresistencia. Por lo tanto, la complementación de estas técnicas, nos permite obtener información, en cuanto a la presencia de genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias nosocomiales Gram negativas ambientales, y respecto, a lo que está sucediendo en nuestros recintos hospitalarios veterinarios, lo cual puede ser incluso, un fiel reflejo de la situación en el país.

3.- OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Detectar genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias Gram negativas mediante técnicas de diagnóstico molecular.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Detectar los genes *tet(A)* y *tet(B)*, que codifican proteínas de eflujo activo en bacterias nosocomiales ambientales Gram negativas, mediante técnica de PCR convencional.
- Detectar los genes *tet(M)* y *tet(O)*, que codifican proteínas de protección ribosomal en bacterias nosocomiales ambientales Gram negativas, mediante técnica de PCR convencional.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Esta investigación se realizó como parte del proyecto FIV 4602016: “Detección de genes de resistencia a antibióticos y biocidas en bacterias nosocomiales aisladas en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile”, desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

4.1. Diseño experimental. Desde diferentes dependencias (salas de hospitalización, consultas, pabellones quirúrgicos y salas de rayos X) de los hospitales clínicos veterinarios de la Universidad de Chile, se tomaron 120 muestras desde diferentes superficies (jaulas, mesones de trabajo, muebles, máquinas de anestesia y de toma de radiografías). La recolección de muestras se realizó mediante torulados estériles, que se trasladaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento, según metodología de microbiología clásica, que brevemente se describe a continuación: **cultivo y aislamiento bacteriano** por diseminación o agotamiento, mediante el método del reloj, en medios de cultivos especiales para dichos fines. Posterior a la incubación de las placas sembradas se procedió al **estudio morfológico y microscópico de las colonias**, el cual permitió conocer el tipo de bacteria desarrollada, (cocáceas o bacilos, Gram positivos o negativos), lo que indicó si la colonia era de interés para el estudio. De ser así, se sembró en un medio de cultivo especial, para asegurar un desarrollo completamente puro de esa cepa. Luego, se repicó en agar semitendido (cepario) y posteriormente se mantuvo en refrigeración hasta la **identificación de la cepa bacteriana**, utilizando un kit diagnóstico comercial (BBL cristal). La **determinación de susceptibilidad antimicrobiana**, se realizó mediante el método de difusión en placa de Kirby-Bauer, según las normas del “National Committee for Clinical Laboratory Estándar (NCCLS, 1997) empleando: Ampicilina (A), Amoxicilina+ácido clavulánico (Amc), Sulperazona (Sul), Gentamicina (G), Tetraciclina (T), Doxiciclina (D), Enrofloxacino (Enr), Ciprofloxacino (Cip) y Sulfa/Trimetropin (Sxt).

4.2. Muestras. Se consideraron 35 cepas bacterianas obtenidas en hospitales veterinarios de la Universidad de Chile (sedes Bilbao y Facultad) entre los años 2007 y 2008 que cumplieron los siguientes requerimientos: bacterias Gram-negativas descritas como nosocomiales, cuyo

perfil de susceptibilidad por el método de Kirby-Bauer indicó sensibilidad intermedia y/o resistencia a tetraciclina y doxiciclina (Cuadros 2, 3).

Cuadro 2

Bacterias nosocomiales Gram negativas obtenidas durante el año 2007 y su perfil de susceptibilidad a un panel de antimicrobianos (según Kirby-Bauer).

#	Especie	Enr	Cip	A	Amc	T	D	Sxt	G	Sul
1	<i>E.cloacae</i>	S	S	R	R	SI	SI	S	S	S
2	<i>E.cloacae</i>	S	S	R	R	S	SI	S	S	S
3	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	SI	S	SI	S	S	S
5	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	S
6	<i>E.cloacae</i>	SI	S	R	R	S	R	R	R	S
7	<i>E.cloacae</i>	SI	S	R	R	S	R	R	R	S
8	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	R	SI	R	S	R	S
9	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S
10	<i>E.coli</i>	R	R	R	SI	R	R	R	R	S
11	<i>E.coli</i>	R	R	R	SI	R	R	R	R	R
12	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	SI	R	S	S
13	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S
14	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	SI	R	S	S
15	<i>P.aeruginosa</i>	R	S	R	R	R	R	R	S	S
16	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	R	R	SI	R	R	S	S
17	<i>P.aeruginosa</i>	SI	S	R	R	R	R	R	S	S
18	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	R	R	R	R	R	S	S
19	<i>A.baumannii</i>	S	S	R	R	S	S	S	S	S
20	<i>C.freundii</i>	S	S	R	R	S	SI	R	S	S

Enr(enrofloxacino); **Cip**(ciprofloxacino); **A**(ampicilina); **Amc**(amoxicilina+ácido clavulánico); **T**(tetraciclina); **D**(doxiciclina); **Sxt**: (sulfa+trimetropin); **G**(gentamicina); **Sul**(sulperazona); **R**: resistente; **SI**: sensibilidad intermedia; **S**: sensible.

Cuadro 3

Bacterias nosocomiales Gram negativas obtenidas durante el año 2008 y su perfil de susceptibilidad a un panel de antimicrobianos (según Kirby-Bauer).

#	Especie	Enr	Cip	A	Amc	T	D	Sxt	G	Sul
21	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	R	SI	SI	R	R	R
22	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	R	S	SI	S	R	R
23	<i>E.cloacae</i>	S	S	R	SI	S	S	S	S	R
24	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
25	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	R
26	<i>E.cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
27	<i>E.cloacae</i>	SI	R	SI	R	SI	R	R	R	R
28	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
29	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
30	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	S	S	R	R	S
31	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
32	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
33	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
34	<i>P.agglomerans</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35	<i>A.baumannii</i>	S	S	S	S	SI	S	S	S	R

Enr(enrofloxacino); **Cip**(ciprofloxacino); **A**(ampicilina); **Amc**(amoxicilina+ácido clavulánico); **T**(tetraciclina); **D**(doxiciclina); **Sxt**(sulfatrimetoprin); **G**(gentamicina); **Sul**(sulperazona); **R**: resistente; **SI**: sensibilidad intermedia; **S**: sensible.

4.3. Obtención del ADN bacteriano. La extracción de ADN bacteriano se realizó mediante la utilización de un kit comercial para extracción y purificación (Genomic DNA Purification kit, Fermentas®), desde cultivos de 10^6 UFC/ml. Brevemente, a 200 μ L de cultivo bacteriano, se agregaron 400 μ L de solución de lisis, se incubó por cinco minutos a 65° C, homogenizando manualmente cada 1,5 minutos. Inmediatamente, se agregaron 600 μ L de cloroformo mezclando suavemente e invirtiendo cinco veces. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos (Heraus Sepatech Biofuge®).

Al finalizar la centrifugación, se colectó la fase superior en un tubo Eppendorf y se agregaron 800 μ L de solución de precipitación, se mezcló suavemente y se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos. El pellet obtenido se resuspendió agregando 100 μ L de solución 1.2 M de cloruro de sodio. A esta mezcla, se le agregó 300 μ L de etanol frío y se mantuvo a -20° C por diez minutos. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por cuatro minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 μ L de agua libre de nucleasas (Winkler®). Finalmente, este ADN se usó inmediatamente para realizar la prueba de PCR, o bien, se almacenó a 4° C por no más de un mes.

4.4. Detección de genes mediante la técnica de PCR. Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0.2 ml y un protocolo que incluyó las temperaturas, el tiempo estimado para cada etapa y el número de ciclos aplicables, según el gen a detectar.

4.4.1. Partidores: Cuadro 4.

Genes *tet(A)* y *tet(B)*. La secuencia de los partidores se seleccionó por su alta especificidad, amplificando segmentos de 950 pb y 650 pb, respectivamente (Martí *et al.*, 2006).

Genes *tet(M)* y *tet(O)*. La secuencia de los partidores se seleccionó por su alta especificidad, amplificando segmentos de 1862 pb y 1723 pb, respectivamente (Trzcinski *et al.*, 2000).

Cuadro 4.

Gen	Secuencia	Tamaño (pb)
<i>tet(A)</i>	tetA-up: 5' - GTAATTCTGAGCACTGTCGC - 3' tetA-rev: 5' - CTGCCTGG ACCACATTGCTT- 3'	950
<i>tet(B)</i>	tetB-up: 5' - TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG - 3' tetB-rev: 5' - GTAATGG GCCAATAACACCG - 3'	650
<i>tet(M)</i>	tetM-up: 5' - AGTTTTAGCTCATGTTGATG -3' tetM-rev: 5' - TCCGACT AT TTAGACGACGG - 3'	1862
<i>tet(O)</i>	tetO-up: 5' - AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC- 3' tetO-rev: 5' - CGGCG GGGTTGG CAA ATA - 3'	1723

4.4.2. Mezcla de la reacción para realizar la prueba de PCR.

Se utilizó el kit 2X PCR Master Mix (Fermentas®), que contiene la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl₂. En un tubo Eppendorf de 0.2 mL se adicionó 12.5 µL del Master Mix, 5 µL de cada uno de los partidores y 5 µL de la muestra de ADN, obteniendo un volumen total de 27.5 µL. Se procedió a su homogenización utilizando un vortex para asegurar la mezcla de los reactivos.

4.4.3. Amplificación del ADN.

La amplificación de ADN se realizó según los siguientes protocolos (Cuadro 5):

Cuadro 5.

Denaturación inicial: 94°C (1 minuto).			
gen	ciclos	Protocolo (denaturación, alineamiento, elongación)	Tamaño (pb)
<i>tet(A)</i>	30	94° C por un minuto, 55° C por un minuto y 72° C por un minuto (Martí <i>et al.</i> , 2006).	950
<i>tet(B)</i>			650
Elongación final: 72°C (5 minutos)			

Denaturación inicial: 95°C (1 minuto)			
gen	ciclos	Protocolo (denaturación, alineamiento, elongación)	Tamaño (pb)
<i>tet(M)</i>	35	95° C por un minuto, 50° C por un minuto y 72° C por 1, 5 minutos (Trzcinski <i>et al.</i> , 2000)	1862
<i>tet(O)</i>	35	95° C por un minuto, 55° C por un minuto y 72° C por 1, 5 minutos (Trzcinski <i>et al.</i> , 2000)	1723
Elongación final: 72°C (5 minutos)			

4.5. Visualización de los productos amplificados.

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (Winkler®) en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas ®). El producto de PCR se mezcló con 1 µL del producto comercial de carga, 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas ®), que posee glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol para verificar el progreso de la migración de las bandas de ADN. Una alícuota de 6 µL de esta mezcla se depositó en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V aproximadamente por cuarenta minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 2000 pb Hyperladder II (Bioscan). Luego de la electroforesis, el gel se sometió a incubación en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo ®) y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP ®), y fotografiado con película Polaroid ®.

4.6. Normas de bioseguridad en el laboratorio. El trabajo de laboratorio se realizó considerando el uso de delantal cerrado y guantes, en especial en el momento de la tinción del gel con bromuro de etidio, por las propiedades mutagénicas de esta sustancia. En la visualización del gel en el transiluminador, se contempló el uso de gafas de seguridad y el empleo de una placa acrílica para evitar la radiación ultravioleta. Una vez fotografiado el gel, se eliminó en una caja especial para finalmente incinerarla.

5.- RESULTADOS.

5.1. Detección de los genes *tet(A)* y *tet(B)* que codifican proteínas de eflujo activo y genes *tet(M)* y *tet(O)* que codifican proteínas de protección ribosomal en bacterias nosocomiales ambientales Gram negativas, mediante técnica de PCR convencional (Cuadro 6)(Visualización del gel de agarosa luego del PCR, ver Anexo).

Cuadro 6
Bacterias nosocomiales Gram negativas, resistencia a tetraciclinas y presencia/ ausencia de genes de resistencia (año 2007).

#	Especie	T	D	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>
1	<i>E.cloacae</i>	SI	SI	+	-	-	+
2	<i>E.cloacae</i>	S	SI	-	-	-	-
3	<i>E.cloacae</i>	S	S	-	-	-	-
4	<i>E.cloacae</i>	S	SI	-	-	-	-
5	<i>E.cloacae</i>	S	S	-	-	-	-
6	<i>E.cloacae</i>	S	R	-	-	-	+
7	<i>E.cloacae</i>	S	R	+	-	-	-
8	<i>E.cloacae</i>	SI	R	-	-	-	-
9	<i>E.cloacae</i>	R	R	+	+	-	+
10	<i>E.coli</i>	R	R	-	+	-	-
11	<i>E.coli</i>	R	R	-	+	-	+
12	<i>E.coli</i>	S	SI	-	-	-	-
13	<i>E.coli</i>	R	R	-	+	-	+
14	<i>E.coli</i>	S	SI	-	+	-	-
15	<i>P.aeruginosa</i>	R	R	-	+	-	+
16	<i>P.aeruginosa</i>	SI	R	-	-	-	+
17	<i>P.aeruginosa</i>	R	R	-	-	-	+
18	<i>P.aeruginosa</i>	R	R	+	+	-	+
19	<i>A.baumannii</i>	S	S	-	-	-	-
20	<i>C.freundii</i>	S	SI	+	+	-	-

T: Tetraciclina; D: Doxiciclina; S: sensible; SI: sensibilidad intermedia; R: Resistente; (-): ausencia del gen; (+): presencia del gen.

- 5.1.1.- El gen *tet(A)* fue detectado **cinco** veces: en 2/7 y en 3/11 de las cepas resistentes a tetraciclinas y a doxiciclina, respectivamente; en 1/3 y en 2/6 de las cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina y a doxiciclina, respectivamente; en 2/10 de las cepas sensibles a tetraciclinas y no fue detectado en ninguna de las tres cepas sensibles a doxiciclina.
- 5.1.2.- El gen *tet(B)* fue detectado en **ocho** oportunidades: 6/7 y en 6/11 de las cepas resistentes a tetraciclina y a doxiciclina, respectivamente; en 0/3 y 2/6 de las cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina y a doxiciclina, respectivamente; en 2/10 de las cepas sensibles a tetraciclinas y no fue detectado en ninguna de las tres cepas sensibles a doxiciclina.
- 5.1.3.- El gen *tet(M)* **no** fue detectado en ninguna de las cepas estudiadas.
- 5.1.4.- El gen *tet(O)* fue detectado en **nueve** oportunidades: 6/7 y en 8/11 de las cepas resistentes a tetraciclina y a doxiciclina respectivamente; en 2/3 y 1/6 de las cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina y a doxiciclina, respectivamente; en 1/10 de las cepas sensibles a tetraciclinas y no fue detectado en ninguna de las tres cepas sensibles a doxiciclina.

5.2. Detección de los genes *tet(A)* y *tet(B)*, que codifican proteínas de eflujo activo y genes *tet(M)* y *tet(O)* que codifican proteínas de protección ribosomal en bacterias nosocomiales ambientales Gram negativas, mediante técnica de PCR convencional (Cuadro 7)(Visualización del gel de agarosa luego del PCR, ver Anexo).

Cuadro 7

Bacterias nosocomiales Gram negativas, resistencia a tetraciclinas y presencia/ ausencia de genes de resistencia (año 2008).

#	Especie	T	D	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>
21	<i>E.cloacae</i>	SI	SI	-	-	-	+
22	<i>E.cloacae</i>	S	SI	-	-	+	-
23	<i>E.cloacae</i>	S	S	-	-	-	+
24	<i>E.cloacae</i>	S	S	-	-	-	-
25	<i>E.cloacae</i>	S	S	-	+	-	-
26	<i>E.cloacae</i>	S	S	-	-	-	+
27	<i>E.cloacae</i>	SI	R	-	-	+	-
28	<i>E.coli</i>	S	S	-	-	-	+
29	<i>E.coli</i>	R	R	-	+	-	+
30	<i>E.coli</i>	S	S	-	+	+	-
31	<i>E.coli</i>	S	S	-	-	-	-
32	<i>E.coli</i>	S	S	-	+	-	+
33	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	-	+	-	+
34	<i>P.agglomerans</i>	S	S	+	+	-	+
35	<i>A.baumannii</i>	SI	S	-	-	-	-

T: Tetraciclina; D: Doxiciclina; S: sensible; SI: sensibilidad intermedia; R: Resistente; (-): ausencia del gen; (+): presencia del gen.

- 5.2.1.- El gen *tet(A)* fue detectado sólo **una** vez; en 1/ 11 de las cepas sensibles tanto a tetraciclina como a doxiciclina.
- 5.2.2.- El gen *tet(B)* fue detectado en **seis** oportunidades: 1/1 y en 1/ 2 de las cepas resistentes a tetraciclina y a doxiciclina respectivamente; no fue detectado en cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina o a doxiciclina; y en 5/11 de las cepas sensibles a tetraciclina o a doxiciclina.
- 5.2.3.- El gen *tet(M)* fue detectado en **tres** oportunidades, no en la cepa resistente a tetraciclina, pero sí en 1/2 de las cepas resistentes a doxiciclina; en 1/3 y 1/2 de las cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina y a doxiciclina, respectivamente y en 2/11 y en 1/11 de las cepas sensibles a tetraciclina y a doxiciclina, respectivamente.
- 5.2.4.- El gen *tet(O)* fue detectado en **ocho** oportunidades: en la cepa resistente a tetraciclina y en 1/2 de las cepas resistentes a doxiciclina; en 1/3 y en 1/2 de las cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina y a doxiciclina, respectivamente; en 6/11 de las cepas sensibles a tetraciclina y a doxiciclina.

6.- DISCUSIÓN.

La participación de agentes bacterianos en infecciones intrahospitalarias ha cobrado gran importancia debido a un incremento en aquellas producidas por bacterias multiresistentes. Así, en la actualidad, las infecciones por bacterias Gram negativas son relevantes en pacientes hospitalizados, especialmente en aquellos que permanecen en las unidades de cuidados intensivos. Por otra parte, si se considera que los mecanismos que utilizan las bacterias para enfrentar a los antibióticos están en constante evolución, la multiresistencia se traduce en un desafío médico al momento de elegir el antimicrobiano adecuado para instaurar una terapia eficaz (Chopra y Roberts, 2001; Curcio e Istúriz, 2006; Martí *et al.*, 2006, Tafur *et al.*, 2008).

En consideración a lo anterior, en esta Memoria de Título se detectó la presencia de genes involucrados en la resistencia antimicrobiana en algunas cepas bacterianas Gram negativas, específicamente aquellas relacionadas con infecciones nosocomiales que afectan a los animales de compañía o animales mayores. En particular, la detección de cuatro genes involucrados en la resistencia a tetraciclinas (genes *tet*) en estas bacterias, constituye un avance en esta materia de estudio, pues no sólo se logró la detección de estos genes en bacterias resistentes, sino que sorprendentemente en otras que presentan sensibilidad intermedia e incluso en aquellas que resultaron sensibles al antimicrobiano, según el método de difusión de Kirby-Bauer.

Para este estudio se eligieron los genes *tet(A)* y *tet(B)* involucrados en la generación de proteínas de eflujo activo, y los genes *tet(M)* y *tet(O)*, con la generación de proteínas de protección ribosomal, que corresponden a los dos mecanismos más estudiados en relación a resistencia antimicrobiana a tetraciclinas (Trieber y Taylor, 2002). Las cepas bacterianas fueron obtenidas en los años 2007 y 2008, lo cual podría permitir una comparación cualitativa temporal, considerando que la frecuencia de los genes detectados puede variar entre diferentes poblaciones, establecimientos de salud, instalaciones y países (Miranda *et al.*, 2003; OMS, 2003).

Así, un primer punto a considerar lo constituye la elevada multiresistencia observada en las cepas en estudio (cuadros 2 y 3), incluyendo aquellas como las señaladas con los números 11 y 13 (*E.coli*; 2007), que presentan resistencia a ocho de los nueve antimicrobianos probados, o

bien, la cepa número 29 (*E.coli*; 2008) que presenta resistencia a todos los antimicrobianos probados. Lo anterior se traduce en que un 90% de las cepas son resistentes a algún antimicrobiano y un 50 % son multiresistentes. Esta alta resistencia observada en *E.coli* es mayor a la encontrada en un estudio anterior realizado en Alemania, en el cual un 40% y un 32% del total de cepas de *E. coli* fueron resistentes y multiresistentes, respectivamente (Guerra *et al.*, 2003). El alto porcentaje de resistencia podría explicarse por la presión de selección ejercida sobre las bacterias en animales y humanos. Más aún, en el caso de *E.coli*, esta cualidad se ve favorecida debido a su característica de comensal y a que ha adquirido resistencia a muchos de los antimicrobianos, incluyendo las tetraciclinas, mediante el uso intensivo e indebido de estos agentes (Bryan *et al.*, 2004; Tuckman *et al.*, 2007).

Respecto de la detección de genes de resistencia a tetraciclina en *E.coli*, se detectaron tres de los cuatro genes en estudio: el gen *tet(B)*, involucrado en la generación de proteínas de eflujo activo y los genes *tet(O)* y *tet(M)* responsables de la generación de proteínas de protección ribosomal. En comparación al trabajo de Guerra *et al.* (2003), el porcentaje de detección de *tet(B)* fue mayor (70% versus 42%) y el gen *tet(A)* no se detectó (0% versus 66%). No es posible otra comparación pues en ese estudio no se consideraron los genes *tet(O)* y *tet(M)*.

En segundo lugar, la comparación cualitativa de los cuadros 6 y 7 señala que las frecuencias de detección de los genes *tet(A)*, *tet(M)* y *tet(O)*, experimentan variaciones. Así, se observa una disminución de la frecuencia de detección del gen *tet(A)*, desde 5/20 (25%) a 1/15 (6%); el gen *tet(O)* la aumenta desde 9/20 (45%) a 8/15 (53%) y además es posible detectar en 2008 el gen *tet(M)* en dos cepas de *E.cloacae* (muestras 22 y 27) y en una cepa de *E.coli* (muestra 30), lo que no ocurrió en 2007. Llama la atención que se trate de cepas sensibles o con sensibilidad intermedia a tetraciclinas y doxiciclina o resistente a este último antimicrobiano. Lo anterior, se podría explicar al considerar que existe el mecanismo de conjugación de intercambio de material genético entre cepas bacterianas (Hoffman, 2001; Jones *et al.*, 2006; Tenover, 2006). Se observa también que en el año 2007, 8/11 (73%) de las cepas resistentes a tetraciclina y/o doxiciclina poseen el gen *tet(O)*. En cambio, para 2008, las cepas resistentes tienen el gen *tet(O)* o en su defecto el gen *tet(M)*, sugiriendo la participación del mecanismo de proteínas de protección ribosomal en estas bacterias descritas como nosocomiales. Estas variaciones también fueron observadas por otros autores, quienes sugieren que la frecuencia de detección de un gen de resistencia específico no sigue un patrón temporal (Koike *et al.*,

2007). La variación de la frecuencia de estos genes, puede implicar que la resistencia a tetraciclina en una comunidad microbiana es un fenómeno dinámico sujeto a la persistencia de una población bacteriana, la migración de genes y a la presión de selección (Koike *et al.*, 2007).

En tercer lugar, para el año 2007, de un total de 11 cepas resistentes a tetraciclina o doxiciclina, en 10 de ellas se detectó al menos un gen de resistencia, lo cual representa una concordancia con la literatura en relación a que son los más frecuentemente descritos (Trzcinski *et al.*, 2000; Chopra y Roberts, 2001; Martí *et al.*, 2006). Sólo una cepa resistente (*E.cloacae*, número 8) no presentaría ninguno de los genes en estudio; sin embargo, aún faltarían por detectar al menos otros 35 genes *tet* (Roberts, 2005; Roberts, 2008).

De igual forma, en el año 2008, todas las cepas resistentes a tetraciclinas presentan al menos un gen de resistencia, lo que se condice con estudios similares donde el 97% de las cepas de *E.coli* resistentes a tetraciclinas contenían al menos uno de los genes estudiados, tomando en cuenta eso sí, que el espectro de genes considerados para la detección fue mayor al de este estudio (14 en total, entre ellos : *tet(A)*; *tet(B)*; *tet(M)*; *tet(O)*) (Bryan *et al.*, 2004).

Al respecto, lo más interesante es que las cepas sensibles también presentan genes de resistencia; tanto, que una cepa (número 34) presenta tres de los cuatro genes estudiados. Esto último, puede señalar que la técnica de Kirby-Bauer y la detección de genes de resistencia deberían ser consideradas complementarias al momento de sugerir un tratamiento.

En cuarto lugar, sólo en una cepa (*A. baumannii*) se pudo observar concordancia entre la determinación de susceptibilidad mediante Kirby-Bauer y la presencia/ausencia de algún gen de resistencia, pues no se detectó ninguno de los genes estudiados en esta cepa que presentó sensibilidad (2007) (Cuadro 6) o sensibilidad intermedia (2008) (Cuadro 7). Si bien lo anterior denota una buena noticia, debemos contrastarla con que algunas cepas (*C.freundii*, *E.cloacae*, *E.coli*, *P.aeruginosa* o *P.agglomerans*) aparecen como sensibles o con sensibilidad intermedia según Kirby-Bauer y en “contrasentido” presentan uno, dos, e incluso tres de los genes estudiados. Lo anterior podría ser explicado por la no expresión del gen aunque sea constitutivo del genoma bacteriano, o bien, simplemente confieren un nivel de resistencia intermedio o bajo (Bryan *et al.*, 2004). Además, es sabido que frente a ciertos estímulos, las bacterias expresarán una serie de respuestas buscando favorecer su supervivencia. Dicho de

otra forma, el estímulo provocado por la exposición a ciertas concentraciones de antimicrobianos, generalmente bajas, pueden llevar a la expresión de un grupo específico de genes beneficiosos para las bacterias y, por lo tanto, inducir la acción de un mecanismo de resistencia, lo que se verá reflejado en el perfil de susceptibilidad (Martínez *et al.*, 2008).

Finalmente, este trabajo es parte de un Proyecto pionero en Chile en relación a la detección de genes de resistencia a tetraciclinas en cepas nosocomiales de interés veterinario. Toda la información que pueda aportar en siguientes estudios será una consecuencia del mismo. Por ejemplo, se podrán secuenciar los genes de resistencia descritos y así establecer la identidad nucleotídica, respecto de la información oficial mantenida en el GenBank® y obtener los controles positivos de cada uno de ellos, contribuyendo así, al estudio de la epidemiología molecular de las infecciones nosocomiales.

7.- CONCLUSIONES.

- 1.- La metodología empleada permitió detectar los cuatro genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias descritas como nosocomiales.
- 2.- Los genes detectados no sólo están presentes en las cepas bacterianas definidas como resistentes a tetraciclinas por el Método de Kirby-Bauer.
- 3.- No existe una relación directa entre el resultado de un antibiograma y la detección de los genes de resistencia más frecuentes.
- 4.- La técnica de Biología molecular (PCR) es complementaria a la técnica de Microbiología Clásica (Kirby-Bauer) en la determinación de resistencia en una cepa bacteriana.

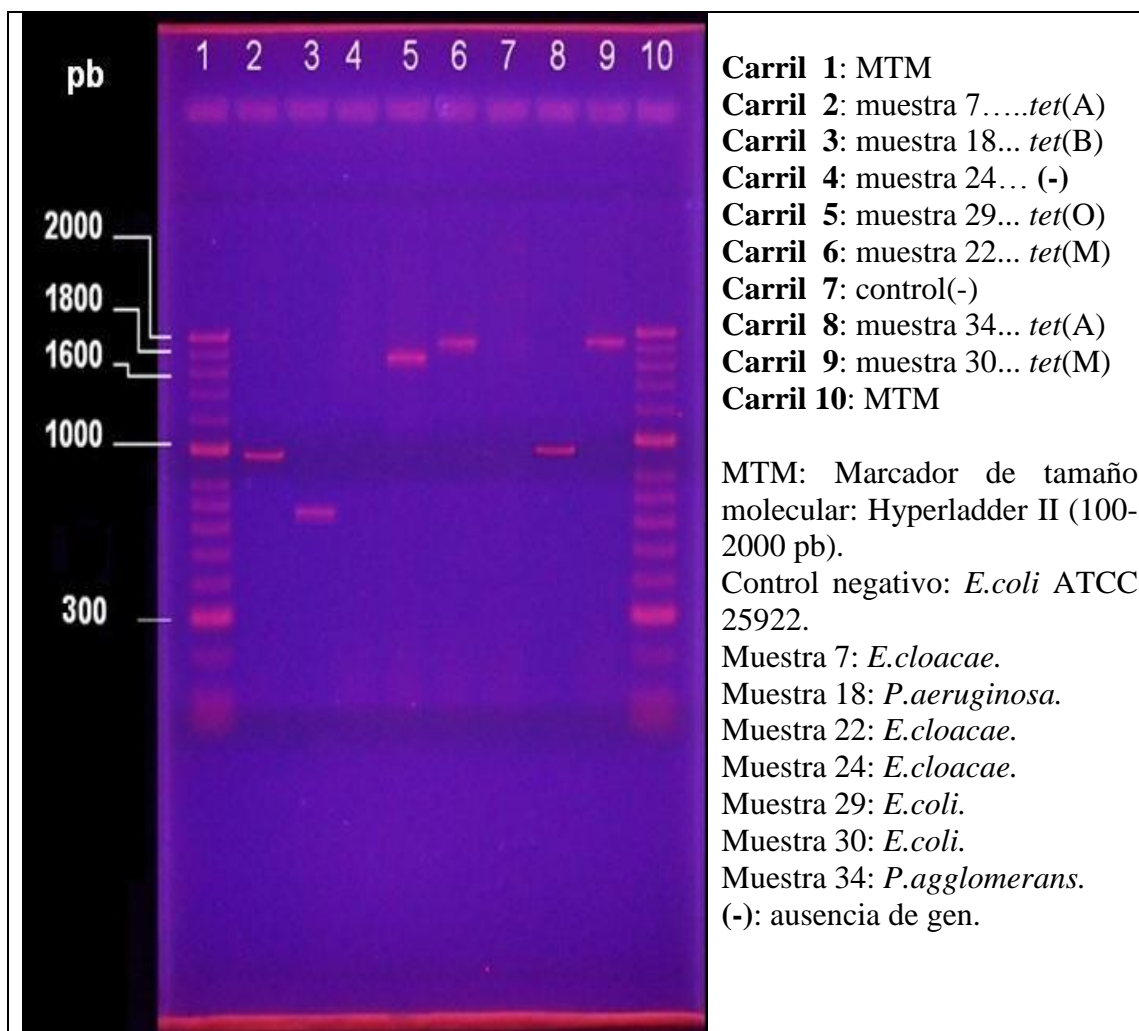
8.- ANEXO:

Visualización de amplicones:

Tamaños moleculares:

tet(A): 950 pb; , *tet(B)*: 650 pb; *tet(M)*: 1862 pb; *tet(O)*: 1723 pb.

Fotografía de un gel de agarosa al 2% sobre un transiluminador de luz UV, previamente incubado en bromuro de etidio.



9.- BIBLIOGRAFÍA.

AENDEKERK, S.; DIGGLE, S.; SONG, Z.; HOIBY, N.; CORNELIS, P.; WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. 2005. The MexGHI- OpmD multidrug efflux pumps controls growth antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomona Aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to cell communication. *Microbiology* 151: 113-125

AHMED, A.; MOTOI, Y.; SATO, M.; MARUYAMA, A.; WATANABE, H.; FUKUMOTO, Y.; SHIMAMOTO, T. 2007. Zoo animals as reservoirs of Gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6686-6690

AL NAIEMI, N.; DUIM, B.; SAVELKOUL, P.; SPANJAARD, L.; DE JONGE, E.; BART, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; DE JONG, M. 2005. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an Intensive Care Unit: Implications for hospital Epidemiology. *Clin Microbiol* 43: 4862- 4864

BARENFANGER, J.; DRAKE, C.; KACICH, G. 1999. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1415-1418

BERGERON, M.; OUELLETTE, M. 1998. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2169-2172

BLAKE, D.; HUMPHRY, R.; SCOTT, K.; HILLMAN, K.; FENLON, D.; LOW, J. 2003. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1087-1097

BOS, M.; TOMMASSEN, J. 2004. Biogenesis of the Gram-negative bacterial Outer membrane. *Science.* 7: 610-616

BRYAN, A.; SHAPIR, N.; SADOWSKY, M. 2004. Frequency and distribution of Tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse humans and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2503 -2507

BURDETT, V. 1986. Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein synthesis. *J. Bacteriol.* 165: 564-569

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. 2003a. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 22: 205-210

- BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.; HAESBROUCK, F.** 2003b. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 175-188
- CABRERA, C.E.; GÓMEZ, R.F.; ZÚÑIGA, A.E.** 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes, una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb. Med.* 38: 149-158
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of actions, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 232-260
- COLLIS, C.; HALL, M.** 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 155-162
- COURVALIN, P.** 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1447-1451
- CURCIO, D.; ISTÚRIZ, R.** 2006. Tigecycline, the first glycylcycline. *Rev Panm Infectol.* 8: 35-42
- DAVIES, J.** 2006. Are antibiotics naturally antibiotics?. *J Ind Microbiol Biot.* 33: 496-499
- DEPARDIEU, F.; PODGLAJEN, I.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P.** 2007. Modes and modulations antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 79-114.
- FAJARDO, A.; MARTÍNEZ, J.** 2008. Antibiotics as signals trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol.* 11: 161-167
- FROST, L.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.; TOUSSAINT, A.** 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 722-732
- GOLDSTEIN, C; LEE, M.; SANCHEZ, S.; HUDSON, C.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B.; GRADY, M.; LIEBERT, C.; SUMMERS, A.; WHITE, D.; MAURER, J.** 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion, animals and exotics. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 45: 723-726
- GUARDABASSI, L.; COURVALIN, P.** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. *In: AARESTRUP, F.* Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, United States of America. Asm Press. 2006. pp. 1-18.
- GUERRA, B.; JUNKER, E.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; LEHMANN, S.; HELMUTH, R.** 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 489-492

HAMILTON-MILLER, J.M. 2004. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. *Int J Antimicrob.* 23: 209-212

HARBARTH, S.; MASUETAUMATELL, C.; SCHRENZEL, J.; FRANCOIS, P.; AKAKPO, C.; RENZI, G.; PUGIN, J.; RICOU, B.; PITTET, D. 2006. Evaluation of rapid screening and preemptive contact isolation for detecting and controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care: an interventional cohort study. *Crit. Care* 10: R25

HOFFMAN, S. 2001. Mechanism of antibiotic resistance. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 23: 464-473

HUNTER, P.; DAWSON, S.; FRENCH, G.; GOOSSEN, H.; HAWKEYS, P.; KUIJPER, J.; NATHWANI, D.; TAYLOR, D.; TEALE, C.; WARREN, R.; WILCOX, M.; WOODFORD, N.; WULF, M.; PIDDOCK, L. 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: i3-i17

JENKINSON, H. 1996. Ins and Outs of Antimicrobials Resistance: Era of the Drug Pumps. *J Dent Res.* 75(2):736 -742

JONES, C.; TUCKMAN, M.; MURPHY, E.; BRADFORD, P. 2006. Identification and sequence of a *tet(M)* tetracycline resistance determinant homologue in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. bacteriol.* 188: 7151-7164

KILONZO-NTHENGE, A.; NAHASHON, S.; CHEN, F.; ADEFOPE, N. 2008. Prevalence and antimicrobial resistance of pathogenic bacteria in chicken and Guinea fowl. *Poult. Sci.* 87: 1841-1848

KOCH, A. 1981. Evolution of antibiotic resistance gene function. *Microbiol. Rev.* 45: 355-378

KOIKE, S.; KRAPAC, I.; OLIVER, H.; YANNARELL, A.; CHEESANFORD, J.; AMINOV, R.; MACKIE, R. 2007. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4813-4823

LAWLEY, T.; WILKINS, B.; FROST, L. Bacterial Conjugation in Gram negative bacteria *In: FUNNELL, B.; PHILLIPS, G.* Plasmid Biology. Washington, United States of America. Asm Press. 2004. pp. 203 – 226

LECLERCQ, R. 2002. Mechanism of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* 34: 482 – 492

LEVY, S. 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 92: 658-718

- LEVY, S.; MARSHALL, B.** 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: S122-S129
- LIVERMORE, D.** 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Inf. Dis.* 36: S11- S23.
- LO, A.; FELDMAN, S.** 1994. Polymerase Chain Reaction: basic concepts and clinical applications in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 30: 250-260
- MAHAMOUD, A.; CHEVALIERI, J.; ALIBERT-FRANCO, S.; KERN, W.; PAGE, J.** 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 1223-1229
- MARTÍ, S.; FERNANDEZ-CUENCA, F.; PASCUAL, F.; RIBERA, A.; RODRIGUEZ-BAÑO, J.; BOU, G.; CISNEROS, J.; PACHON, J.; VILA, J.** 2006. Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24: 77-80
- MARTÍNEZ, J.; FAJARDO, A.; GARMENDIA, L.; HERNÁNDEZ, A.; LINARES, L.; MARTÍNEZ-SOLANO, L.; SÁNCHEZ, M.** 2008. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Review* 33: 44-65
- MAZEL, D.** 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 608 – 620
- MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J.** 2004. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Vet Med.* 49: 79 -100
- MIKO, A.; PRIES, K.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R.** 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 1025-1033
- MIRANDA, C.; KEHRENBERG, C.; ULEP, C.; SCHWARZ, S.; ROBERTS, M.** 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 47: 883-888
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A.** 1987. Specific síntesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- MURPHY, C.; REID-SMITH, R.; PRESCOTT, J.; BONNETT, B.; POPPE, C.; BOERLIN, P.; WEESE, J.; JANECKO, N.; MCEWEN, S.** 2009. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *Can Vet J.* 50: 1047-1053
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDART.** 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard. NCCLS document M2-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standart, Wayne, Pa

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2003. Epidemiología de las infecciones nosocomiales [en línea] cap.1. *In:* Prevención de las infecciones nosocomiales <<http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/PISpanish3.pdf>> [consulta: 08-04-2009].

PELEG, A.; ADAMS, J.; PATERSON, D. 2007. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 51: 2065-2069

PERRETEN, V.; VORLET-FAWER, L.; SLICKERS, P.; EHRICHT, R.; KUHNERT, P.; FREY, J. 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2291-2302

PIDDOCK, L. 2006a. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 629-636

PIDDOCK, L. 2006b. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 382-402

POOLE, K. 2004. Efflux-Mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 12-26

RICE, L.B. 2006. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 43: S100-S105

ROBERTS, M.C. 2003. Tetracycline therapy: update. *Clin. Infect. Dis.* 36: 462-467

ROBERTS, M.C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245: 195-203

ROBERTS, M.C. 2008. Tetracycline genes. [en línea] <<http://faculty.washington.edu/marilyn/tetweb4.pdf>> [consulta: 01-04-2009]

RUIZ-BRAVO, A.; CAMACHO, E.; GÓMEZ-LUS, M.; SAMPEDRO, A. Genética bacteriana. *In:* DE LA ROSA, M.; PRIETO, J. Microbiología para ciencias de la salud. 2^a ed. Elsevier. Madrid, España. 2003. pp. 19- 26

RUIZ, I.; DIEMOND, J.; PACHECO, D.; VELÁSQUEZ, M.; FLORES, E.; MIRANDA, M. 2007. Resistencia en bacterias aisladas en pacientes con infecciones nosocomiales. *Inf. Microbiol.* 27: 15-21

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.; STOFFEL, S.; SHARF, S.; HIGUSHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K.; EHRlich, H.A. 1988. Primer – directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487- 491

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32: 201-225

- SINGH, A.; GOERING, R.; SIMJEE, S.; FOLEY, S.; ZERVOS, J.** 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 512-530
- SUSSMANN, O.; MATTOS, L.; RESTREPO, A.** 2004. Resistencia bacteriana. Unidad de infectología, Hospital Universitario San Ignacio. Bogotá, Colombia. 12p.
- TAFUR, J.; TORRES, J.; VILLEGAS, M.** 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *Infectio.* 12: 217-226
- TANG, Y.; PROCOP, G.; PERSING, D.** 1997. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem.* 43: 2021-2038
- TENOVER, F.** 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 119: S3-S10
- TRIEBER, C.; TAYLOR, D.** 2002. Mutations in the 16S rRna genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J. Bacteriol.* 184: 2131-2140
- TRZCINSKI, K.; COOPER, B.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, C.** 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemoter.* 45: 763- 770
- TUCKMAN, M.; PETERSEN, P; HOWE, A.; ORLOWSKI, M.; MULLEN, S.; CHAN, K.; BRADFORD, P.; JONES, C.** 2007. Ocurrance of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 51: 3205-3211
- VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J.** 2007. Porins, efflux pumps and multidrugs resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemoter.* 59: 1210-1215.
- VILLEDIEU, A.; DIAZ-TORRES, M.; HUNT, N.; MCNAB, R.; SPRATT, D.; WILSON, M.; MULLANY, P.** 2003. Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 47: 878- 882
- VISSER, M.; FLUIT, A.** 1995. Amplification methods for detection of bacterial resistance genes. *J Microbiol. Methods.* 23: 105-116
- WHITE, P.; MCIVER, C.; RAWLINSON, W.** 2001. Integrons and cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 45: 2658-2661
- WOODFORD, N.; SUNDSFJORD, A.** 2005. Molecular detection of antibiotic resistance :when and where ?. *J. Antimicrob. Chemoter.* 56: 259-261
- YIM, G.; DE LA CRUZ, F.; SPIEGELMAN, G.; DAVIES, J.** 2006. Transcription modulation of *Salomonella enterica* Serovar Typhimurium promoters by Sub-Mic levels of Rifampin. *J. Bacteriol.* 188: 7988-7991

