



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



**DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A BIOCIDAS EN BACTERIAS
NOSOCOMIALES MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

PABLO FRANCISCO CÉSPEDES DONOSO

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

PROFESOR GUÍA: MARÍA ANTONIETA JARA OSORIO

Proyecto FIV 4602016

SANTIAGO-CHILE

2009

INTRODUCCIÓN

Las infecciones representan la mayor amenaza para la salud animal y humana, por este motivo desde tiempos antiguos, se han buscado formas de controlarlas, y en los primeros años del siglo XX se desarrollaron las primeras moléculas quimio-terapéuticas (sulfas) y el primer antibiótico (penicilina), que se utilizaron clínicamente en la década de los cuarenta, logrando controlar infecciones que hasta ese momento eran de altísima morbilidad y difícil tratamiento. Sin embargo, pocos años después de su uso masificado surge el fenómeno de resistencia bacteriana, que ha demostrado la gran capacidad de adaptación, supervivencia y evolución de los procariontes, las formas de vida más exitosas del planeta.

Desde la descripción del primer mecanismo de resistencia a penicilinas por Abraham y Chain en 1940, distintos expertos insistieron que el uso de antimicrobianos debía obedecer cierta racionalidad para atenuar la presión selectiva que fomenta el desarrollo de mecanismos de resistencia, con el propósito mayor, de no hacer inefectivos los escasos recursos terapéuticos con los que se contaba. En la actualidad, el desarrollo de la industria farmacéutica, ha permitido la síntesis de una gran variedad de moléculas, que surgieron como una solución a los fenómenos de resistencia específica a las moléculas más antiguas. Lamentablemente, se subestimó la capacidad adaptativa de los procariontes, que respondieron en un lapso corto de tiempo con mecanismos nuevos, y cada vez más eficientes, para evadir la acción de estos agentes terapéuticos, al extremo que hoy, hasta las moléculas más novedosas como los derivados carbapenémicos y monobactámicos se demuestran inefectivos al momento de combatir bacterias nosocomiales.

Las infecciones nosocomiales son aquellas adquiridas en un hospital y que se manifiestan después de 48 a 72 horas de la admisión de los pacientes. Son causadas por bacterias ubicuas, oportunistas y altamente resistentes, que afectan preferentemente aquellos pacientes con grados variables de compromiso inmunológico, afectando su evolución y recuperación. Los desinfectantes y antisépticos (biocidas) se utilizan en la práctica médica como parte esencial de los protocolos de bioseguridad adoptados para minimizar la diseminación de este tipo de infecciones entre el personal, los pacientes y recintos hospitalarios, pero incluso a estos compuestos se ha demostrado resistencia.

Estas bacterias poseen fenotipos de multiresistencia (definida como resistencia a dos o más antimicrobianos) que reflejan la gran influencia del medio ambiente hospitalario en el

surgimiento de mecanismos de insensibilidad a distintos compuestos tóxicos, que se encuentran en concentraciones residuales (sub-letales) en el ambiente, ya sea por la adquisición de mutaciones o, por la adquisición de casetes génicos, que a su vez, permiten la selección de clones bacterianos exitosos y el intercambio de genes de resistencia incluidos en integrones, plasmidos y/o transposones. Estos, junto a las bombas de eflujo, explican la íntima relación entre la resistencia múltiple a antimicrobianos y la observada a biocidas.

La resistencia a biocidas representa una de las mayores amenazas para la salud pública, debido a que los mecanismos involucrados se caracterizan por ser inespecíficos, afectando a una amplia gama de sustancias no relacionadas estructuralmente. Es por esto, que se han orientado esfuerzos en complementar la vigilancia epidemiológica de resistencia a antimicrobianos, pesquisando la resistencia a biocidas mediante técnicas de diagnóstico molecular, dentro de las cuales la detección de los genes involucrados mediante reacción en cadena de la polimerasa entrega información atinente en el desarrollo de nuevas estrategias de control, adaptando vigorosamente los protocolos utilizados a la realidad epidemiológica. Atendiendo a esta necesidad emergente, se ha focalizado este trabajo de Memoria de Título a la detección de genes de resistencia a biocidas en aislados nosocomiales, como primer acercamiento en la medicina veterinaria nacional, con el fin de entregar conocimiento que permita el control de este tipo de infecciones.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES.

1.1. Agentes bacterianos involucrados y cuadros clínicos:

Las bacterias se caracterizan por ser ubicuas en la naturaleza. Como parte de la flora normal de los individuos, poseen además una baja patogenicidad y virulencia, lo que les permite vivir en armonía con su hospedero. Estas bacterias se transmiten constantemente entre animales, sin constituirse en un riesgo para la salud. Sin embargo, en el ambiente intrahospitalario se establecen poblaciones bacterianas que coexisten bajo un medioambiente altamente variable y exigente, que las expone a diversas situaciones de estrés, que como fuerza de presión selectiva, han sido la mayor causa del surgimiento de cepas bacterianas altamente resistentes. Esto reviste un problema, debido a que el personal médico, los insumos e instrumental se constituyen en los elementos de transmisión más relevantes entre pacientes (Noguchi *et al.*, 2005; Vali *et al.*, 2008). En la práctica medico veterinaria, este fenómeno también existe, y para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), otras especies del género (*S. intermedius* y *S. pseudointermedius*), y *Escherichia coli* se ha demostrado el importante rol del personal como portador y potencial fuente diseminadora de este tipo de patógenos (Seguin *et al.*, 1999; Tanner *et al.*, 2000; van Duijkeren *et al.*, 2004; Loeffler *et al.*, 2005; O' Mahony *et al.*, 2005; Weese *et al.*, 2005; Strommenger *et al.*, 2006).

La adquisición de patógenos multiresistentes como comensales es la primera etapa en la patogénesis de la infección nosocomial. A pesar de no contar con la maquinaria molecular de virulencia (toxinas especializadas, sistemas de transporte tipo III, etc.), la adquisición de estas infecciones ocurre principalmente en individuos inmunocomprometidos, bajo un régimen de antimicrobianos o procedimientos invasivos con la utilización de antisépticos por largos periodos de tiempo. Esto favorece la multiplicación de aquellas bacterias infectantes con el potencial genético-molecular de resistirlos, pudiendo generar infecciones graves que comprometen la sobrevivencia y recuperación de los pacientes por la naturaleza del proceso infeccioso y su no respuesta al tratamiento (Stickler, 2002) (Cuadro 1).

En medicina este tema lleva décadas de intensa investigación, y actualmente, las bacterias con la mayor importancia clínico-epidemiológica son *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y enterococos resistentes a vancomicina (ERV), ambos Gram-positivos. Los Gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias le siguen en importancia (DHQP, 2001).

Cuadro 1: Infecciones descritas según bacteria nosocomial.

Especie Bacteriana	Infecciones y Cuadros clínicos descritos (Referencia)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriemia, infección de heridas quirúrgicas, endocarditis, endoftalmitis, meningitis. (Yamamoto <i>et al.</i> , 1988).
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Pioderma, endocarditis, infección de heridas quirúrgicas, otitis (Sasaki <i>et al.</i> , 2007).
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infección de heridas quirúrgicas, peritonitis (Lee <i>et al.</i> , 2003a; Lee <i>et al.</i> , 2003b; Roberts <i>et al.</i> , 2006).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infección del tracto urinario asociado a catéteres, neumonías asociadas a ventiladores respiratorios o máquinas de anestesia inhalatoria, bacteriemia (Hosein <i>et al.</i> , 2002; Sekiguchi <i>et al.</i> , 2005).
<i>Escherichia coli</i>	Infección del tracto urinario bajo e infección de heridas quirúrgicas (Nolan <i>et al.</i> , 1987; Sanchez <i>et al.</i> , 2002)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía, infección del tracto urinario, infección de heridas, bacteriemia (Fang <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2004; Ogawa <i>et al.</i> , 2006; Li <i>et al.</i> , 2008).
<i>Serratia marcescens</i>	Bacteriemia, endocarditis, osteomielitis, meningitis infección de heridas e infección de tractos respiratorio y urinario (Shahcheraghi <i>et al.</i> , 2007; Matsuo <i>et al.</i> , 2008).
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter diversus</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i>	Infecciones de tracto respiratorio y urinario, bacteriemia, endocarditis, infección de heridas, peritonitis, meningitis, enteritis, osteomielitis (Kim <i>et al.</i> , 2003).
<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacteriemia, infecciones del tracto respiratorio y urinario bajo, infecciones de piel, endocarditis, peritonitis, infecciones de sistema nervioso central y ojo, osteomielitis y artritis séptica (Sanders y Sanders, 1997).
<i>Proteus mirabilis</i>	Infecciones del tracto urinario bajo, pielonefritis, cálculos vesicales y/o renales asociados y bacteriemia (Stickler, 2002).
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Neumonías asociadas a ventiladores o máquinas de anestesia, bacteriemia, infección de piel y tejidos blandos asociadas a heridas o quemaduras, infección del tracto urinario, meningitis, endocarditis y queratitis (Peleg <i>et al.</i> , 2008).

1.2. Factores de riesgo en la transmisión intra-hospitalaria:

Existen diversas situaciones que favorecen la adquisición y diseminación de este tipo de patógenos entre las cuales se pueden mencionar (Hosein *et al.*, 2002):

- i. Escaso control del movimiento de pacientes y personal entre salas y hospitales.
- ii. Paciente inmunocomprometido o con enfermedad subyacente grave.
- iii. Procedimientos invasivos.
- iv. No adopción de prácticas de higiene y desinfección por parte del personal.
- v. Admisión de pacientes bajo tratamiento antibiótico inadecuado a un patógeno de la comunidad altamente resistente.
- vi. Inadecuada toma y procesamiento de muestras para identificar el patógeno causal de un brote.
- vii. Instauración de tratamiento antimicrobiano incorrecto en términos de molécula terapéutica, dosis, ritmo horario, vía de administración y patógeno objetivo.
- viii. Uso inadecuado de biocidas considerando lugar de aplicación, concentración, tiempo e interacción con otros agentes.
- ix. Omisión de medidas mínimas de desinfección de alto nivel y esterilización en el instrumental médico y quirúrgico.

Considerando estos antecedentes queda de manifiesto el importante papel que juegan el personal, los pacientes, el instrumental y el medio ambiente en las complejas interacciones que determinan la presentación de este tipo de infecciones.

2.- ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN DE INFECCIONES NOSOCOMIALES.

2.1. Biocidas: tipos de antisépticos y desinfectantes:

Biocida es todo aquel compuesto químico utilizado para destruir formas de vida; sin embargo, esta definición es bastante general y algunos autores prefieren denominar germicida a todo aquel utilizado para destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos. Según su efectividad se denominan **esterilizantes** (destruyen todas las formas vegetativas y esporas), **desinfectantes** (disminuyen la carga bacteriana, por su mayor toxicidad deben utilizarse sobre superficies inertes) y **antisépticos** (aplicados sobre tejido vivo). En el contexto de la práctica médica, los dos últimos grupos son los utilizados con mayor frecuencia, motivo por el cual se les prestará especial atención (Fraise, 2002; Russell, 2002a).

Los germicidas a altas concentraciones producen un daño generalizado a la ultraestructura bacteriana, tanto a nivel de la membrana celular como en componentes intracelulares, diferenciándose de esta manera de la acción específica de los antimicrobianos (que reconocen moléculas objetivo específicas). Además, son utilizados a concentraciones mucho mayores, generalmente letales para células eucariontes, mientras que los antimicrobianos poseen una toxicidad selectiva. Pese a esto, se ha descrito que bajas concentraciones de triclosán actúan específicamente inhibiendo la enzima *enoyl reductasa*, encargada de la síntesis de ácidos grasos esenciales, mecanismo que ejerce un efecto bacteriostático (Silver y Went, 1967; McMurry *et al.*, 1998; McMurry *et al.*, 1999; Russell, 2002b).

La actividad biocida de un compuesto varía notablemente entre los diferentes tipos de microorganismos e incluso entre distintas cepas de una misma especie. Entre las formas vegetativas, las más resistentes son las micobacterias, luego las Gram negativas, siendo más sensibles las Gram positivas y micoplasmas. Esto se debe en parte, a diferencias en la composición de la pared celular (Maillard, 2002).

Los biocidas varían ampliamente en sus estructuras químicas y aunque el mecanismo preciso de acción refleja esta característica, cuando se usan en altas concentraciones muestran una similitud considerable (Cuadro 2).

Cuadro 2: tipos de biocidas y sus mecanismos de acción (Maillard, 2002; Russell, 2002b).

Compuesto	Efecto en los componentes celulares
Agentes catiónicos	<p>Dañan la pared celular y la membrana citoplasmática promoviendo su ingreso a la célula.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Disrupción de la membrana citoplasmática, interacción con fosfolípidos de membrana (Compuestos de amonio cuaternario (CAC)). 2. Además de lo anterior, coagulan el citoplasma. (Biguanidinas. Incluye Clorhexidina y Alexidina) 3. Interacción con grupos fosfato de ácidos nucleicos, inhibe síntesis de ADN, ARN y traducción. (Colorantes. Incluye acridinas, azul de metileno, cristal violeta, etc.)
Alcoholes	<p>Dañan la membrana citoplasmática con pérdida generalizada de sus funciones.</p> <p>Penetración del solvente en la bicapa lipídica, coagulación e inactivación de enzimas de superficie. Inhiben síntesis de ADN, ARN, proteínas y peptidoglicano.</p>
Aldehídos	<p>Esterilizantes, producen alquilación y formación de uniones irreversibles entre proteínas y ácidos nucleicos.</p> <p>Agentes altamente reactivos, interactúan con grupos amino, carboxilo, hidroxilo y sulfhidrilo de aminoácidos. Incluye glutaraldehído, formaldehído y succinaldehído.</p>
Detergentes aniónicos	<p>Dañan la pared celular y la membrana citoplasmática, afectando su permeabilidad.</p> <p>Monoacetato de dodecilmguanidina produce además degradación del RNA y coagulación del citoplasma.</p>
Fenoles	<p>A baja concentración inhiben enzimas específicas.</p> <p>Hexaclorofeno inhibe la cadena transportadora de electrones y Triclosán inhibe la enzima <i>enoyl reductasa</i>.</p>
Halógenos	<p>Oxidan fosfolípidos e interactúan con grupos tiol.</p> <p>Incluye derivados del cloro y yodóforos.</p>
Peroxígenos	<p>Oxidan fosfolípidos con acumulación de radicales libres de oxígeno.</p> <p>Radicales hidroxilo oxidan grupos tiol de proteínas y enzimas.</p>
Metales	<p>Interactúan con grupos tiol de residuos cisteína de enzimas y ribosomas.</p> <p>Incluye compuestos organomercuriales, plata y cobre.</p>

2.2.- Prevención de las infecciones nosocomiales:

Las medidas instauradas como parte de un programa de control buscan limitar la transmisión de microorganismos entre los pacientes por medio de: **1)** prácticas adecuadas de lavado de manos, uso de guantes y mascarillas; **2)** estrategias de aislamiento; **3)** limitar el riesgo de **infecciones endógenas** reduciendo al mínimo los procedimientos invasivos duraderos y fomentando el uso apropiado de antimicrobianos; **4)** evitar la infección de los miembros del personal y **5)** vigilar las infecciones, identificando los brotes y controlando al (o los) agente (s) patógeno (s) responsable (s) (DHQP, 2001; Ducel *et al.*, 2003).

El uso estratégico de antisépticos y desinfectantes se incluye como pilar fundamental en las normas de bioseguridad. Sin embargo, utilizarlos exige considerar los fenómenos que determinan su efectividad, tanto físico-químicos (tiempo de exposición, temperatura, pH y concentración), como la presencia de materia orgánica (Ducel *et al.*, 2003). La concentración y pH son los factores más importantes, es así como, los agentes aniónicos son más eficaces a pH ácido mientras que los catiónicos lo son a pH alcalino (Maillard, 2002).

Para la desinfección del medio ambiente es necesario eliminar al máximo posible la cantidad de materia orgánica, utilizando aspersión de soluciones de tensoactivos y desinfectantes para limitar la producción de material en suspensión, ya que el proceso de limpieza depende fundamentalmente de la acción mecánica. Para su uso racional es recomendable dividir las instalaciones en cuatro zonas según el riesgo de contaminación: **zona A:** nulo, sin contacto con pacientes; **zona B:** mínimo, cuidado de pacientes no infectados ni inmunocomprometidos; **zona C:** intermedio-alto, cuidado de pacientes infecciosos y **zona D:** crítico, pacientes de cuidado intensivo. En las últimas dos áreas debe utilizarse equipo separado de limpieza para cada habitación (Ducel *et al.*, 2003).

Es necesario estratificar a los pacientes según riesgo de infección y determinar el nivel de desinfección necesarios en el personal e instrumental (Cuadro 3). Se define como **riesgo alto** cuando se exponen cavidades y tejidos estériles o manipulan pacientes con inmunodeficiencia grave; **riesgo intermedio** cuando se utilizan dispositivos que contactan membranas mucosas o piel dañada en pacientes infectados o con algún factor de riesgo – enfermedades subyacentes, edades extremas, etc.- y **riesgo bajo** en condiciones de contacto sobre piel intacta en paciente sano (Ducel *et al.*, 2003).

Cuadro 3: Nivel de desinfección y asepsia según tipo de procedimiento, riesgo de infección y compuestos utilizables (Ducel *et al.*, 2003).

Riesgo	Tipo de procedimiento	Nivel de asepsia	Nivel de desinfección	Ingredientes activos	Espectro de acción
Mínimo	No invasivo. Sin exposición a fluidos.	Lavado simple.	Baja. No crítica.	Aniónicos (D) CAC (D) Clorhexidina (A) Yodóforos (A) Peróxido de hidrógeno (A, D)	Bactericida. Fungicida. Virucida (virus con envoltura).
Intermedio	Invasivo Exposición a fluidos.	Lavado aséptico. Manos y muñeca.	Intermedia. Semicrítica.	Alcohol etílico e isopropílico (A, D). Alcohol yodado (D). Fenoles (A, D).	Bactericida. Fungicida. Virucida (virus sin envoltura). Mico-bactericida.
Alto	Quirúrgico de alto riesgo (endoscopia).	Lavado quirúrgico Manos y antebrazo.	Alta Crítica. Esterilización.	Dióxido de cloro (D). Hipoclorito de sodio 1000 - 5000 ppm (D). Ácido peracético (D). Aldehídos (E).	Bactericida. Fungicida. Virucida. Mico-bactericida. Esporicida.

E: esterilizante, D: desinfectante y A: antiséptico.

3.- RESISTENCIA BACTERIANA: UNA MANIFESTACIÓN DE LA CAPACIDAD ADAPTATIVA DE LOS PROCARIONTES.

3.1. Medio ambiente como fuente de presión selectiva:

Los primeros organismos en ser capaces de colonizar, sobrevivir y crear las condiciones atmosféricas óptimas para el surgimiento de nuevas formas de vida fueron las bacterias. Desde ese procarionte ancestral han derivado todas las formas bacterianas actuales, las que pese a las diversas exigencias que representa el medio ambiente fluctuante en el que habitan, han logrado adaptarse progresivamente, convirtiéndose en las formas de vida predominantes sobre la faz de la tierra (Jenkinson, 1996).

Desde tiempos remotos el ser humano ha debido enfrentarse al desafío de controlar y tratar las infecciones, pero con el desarrollo de la medicina y el descubrimiento de los antibióticos y agentes quimioterapéuticos sintéticos (englobados bajo el término antimicrobianos) se logró aumentar las expectativas de vida y disminuir el tiempo de recuperación de aquellos pacientes infectados. Sin embargo, poco tiempo después de su descubrimiento, se describió el primer mecanismo enzimático capaz de inactivar a las penicilinas (Abraham y Chain, 1940). En respuesta a esta amenaza latente comenzó la búsqueda exhaustiva de nuevas moléculas terapéuticas, pese a esto, el fenómeno sigue en aumento a tal magnitud que cada vez que se comienza a utilizar un nuevo antimicrobiano (como tratamiento de infecciones altamente resistentes) su uso masificado, irracional y verdaderamente injustificado, permite que poco tiempo después surjan cepas resistentes de varias especies bacterianas (Poole, 2005; Cabrera *et al.*, 2007). Esto último pone de manifiesto la necesidad de utilizar los antimicrobianos con un criterio más que la simple experiencia médica y el marco teórico que engloba cada alternativa terapéutica, pues en la actualidad moléculas tan novedosas como el moxifloxacino, las cefalosporinas de espectro extendido, los derivados carbapenémicos y monobactámicos se muestran inefectivos al momento de tratar infecciones bacterianas, especialmente las nosocomiales (DHQP, 2001). De hecho se ha demostrado que el uso de cefalosporinas, carbapenémicos y fluoroquinolonas es un factor de riesgo bien conocido para la adquisición de SARM en humanos, sugiriendo que la presión selectiva generada por los antibióticos ha contribuido a la prevalencia de estas infecciones (Westh *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2007).

La resistencia bacteriana es un fenómeno complejo que involucra la interacción del agente patógeno, el sistema inmune del hospedero y el medio ambiente. Este último como escenario de la resistencia bacteriana *in vivo*, es uno de los factores más importantes, y dentro

de este; la presencia de agentes tóxicos en concentraciones sub-letales, el establecimiento de nichos microambientales y la interacción simbiótica con otras bacterias aparecen como los principales eventos que intervienen en la génesis de la resistencia (Costerton *et al.*, 1987; Watnick y Kolter, 2000; Bloomfield, 2002).

Por otra parte, el sistema inmune del hospedero posee un rol esencial, pues las bacterias no sólo deben utilizar su energía en resistir la acción de los antimicrobianos y biocidas sino que además moléculas propias del hospedero (DHQP, 2001).

3.2.- Biofilms, una estrategia de supervivencia:

En la mayoría de los habitats naturales los microorganismos crecen y sobreviven como biofilms adheridos a superficies orgánicas o inorgánicas, según la disponibilidad de nutrientes del medio (Watnick y Kolter, 2000; Gilbert *et al.*, 2002). “*Biofilm*” corresponde a una organización biológica que involucra a una o más especies bacterianas, asociándose en medicina a muchas infecciones crónicas y oportunistas (Costerton *et al.*, 1987; Stickler, 2002). Este consorcio bacteriano requiere la modificación del patrón de expresión génica y la adquisición de fenotipos especializados capaces de sintetizar una matriz de exopolisacáridos (EPS), principal elemento involucrado en la ventaja adaptativa que envuelve y protege a las células a modo de barrera físico-química (Davey y O’toole, 2000; Gilbert *et al.*, 2002).

El establecimiento de un “*biofilm*” implica una serie de etapas. Primero, frente a condiciones medioambientales adversas una célula móvil denominada colonizadora, busca y se ancla a una superficie, creando condiciones favorables para que lleguen otras células, las que se van asociando progresivamente hasta establecer una *microcolonia*, con variadas condiciones ambientales aprovechadas por distintos grupos de bacterias adaptadas a sus exigencias, creando de esta forma, nichos microambientales. La organización en múltiples capas celulares establece un medio ambiente químicamente heterogéneo con gradientes de gases, nutrientes y potenciales oxido-reducción, determinando la gran variedad de fenotipos relacionados a los distintos microambientes (Gilbert *et al.*, 2002). Un “*biofilm*” maduro posee una modificación a nivel de la expresión génica, con sobre-expresión de genes benéficos (por Ej.: *rpoS*: regulón maestro de respuesta al estrés, genes de EPS y genes de bombas de eflujo) y la inhibición de los genes perjudiciales para la integridad de la matriz (Foley *et al.*, 1999; Watnick y Kolter, 2000).

En el medio ambiente hospitalario los “biofilms” pueden colonizar prácticamente todas las superficies (acero inoxidable, catéteres endovenosos, sondas uretrales y epitelios) siendo fuente continua de infección, debido a que las bacterias resguardadas en ellos son intrínsecamente más resistentes que las formas de vida libre (Costerton *et al.*, 1987; Bloomfield, 2002; Stickler; 2002). Esto es explicado por los siguientes fenómenos: **1)** como estrategia de supervivencia, implica la adquisición de fenotipos de respuesta al estrés caracterizados por su baja tasa crecimiento y la sobre-expresión del **regulón rpoS** y de **operones de eflujo** con sobre-actividad de sus sistemas de eliminación de sustancias tóxicas ; **2)** el gradiente químico actúa inhibiendo in situ algunos biocidas, mientras que la matriz retiene enzimas y metabolitos, que junto al EPS –como resina aniónica- actúan inactivando directamente compuestos catiónicos y apolares; **3)** las células superficiales (más sensibles) al entrar en contacto con el biocida, lo inactivan de manera consuntiva, ofreciendo una gran cantidad de nutrientes derivados de la lisis bacteriana, para que las células persistentes (más profundas) restablezcan rápidamente el “biofilm”; **4)** el estrecho contacto celular facilita un gran flujo de información genética, con altas tasas de recombinación e intercambio de genes de resistencia; y de esta forma, **5)** la concentración de compuesto activo que alcanza a las células es mínima, favoreciendo la sobre-expresión y selección de los elementos genéticos de resistencia, con expansión de los clones más resistentes (Miller y Sulavick, 1996; Watnick y Kolter, 2000; Gilbert et al., 2002).

3.3.- Mecanismos de transferencia de información genética entre bacterias:

Los fenómenos de resistencia bacteriana no sólo amenazan el éxito de nuevos tratamientos antibióticos y la efectividad de las medidas de desinfección y antisepsia aplicadas en protocolos de bioseguridad, también lo hacen afectando directamente la inocuidad de diversos productos de origen animal. Se han descrito casos de transmisión hacia la especie humana de bacterias potencialmente peligrosas a través de alimentos y por contacto directo (Teale, 2002; Duquette y Nuttall, 2004). Considerando estos antecedentes, toma gran relevancia el intercambio de determinantes de resistencia entre especies bacterianas, en especial, de los elementos móviles como integrones, plasmidos y transposones conjugativos. Comprender el potencial impacto de estos procesos evolutivos en el fenómeno de resistencia requiere un análisis más detallado de los eventos involucrados.

En poblaciones naturales la transferencia de material genético potencia el origen, adaptación y rápida evolución de nuevos clones entregándole genes ventajosos, provenientes

de distintas líneas, a una misma célula. Se describen tres mecanismos de transmisión horizontal: conjugación, transducción y transformación. A diferencia de las dos últimas, la primera posee la mayor relevancia epidemiológica debido a que involucra la transmisión de segmentos específicos de material genético entre bacterias no emparentadas. De esta manera, el proceso facilita el intercambio de genes de resistencia entre bacterias de distinto origen frente a determinada presión selectiva (Wilkins y Frost, 2002).

La **Conjugación** es un sistema de transferencia trascendental en la evolución y ecología de los procariontes, que permite la transferencia de elementos conjugativos como plasmidos y transposones. Estos requieren grupos complejos de genes que codifican el sistema de transferencia y subsiguiente establecimiento en la célula receptora de dichos elementos. Este fenómeno se sustenta en el reconocimiento celular y establecimiento de un apareamiento estable, facilitado por elementos especializados, dentro de los que se describe un ***pili sexual*** para bacterias Gram negativas y una ***sustancia agregante (SA)*** de naturaleza proteica en Gram positivas. Una vez conseguido este apareamiento, se forma un poro conjugativo, a través del cual se transfiere DNA de hebra simple sólo o como un complejo nucleoproteico (relaxosoma). El proceso finaliza con la síntesis de hebras complementarias a la hebra simple en el donante y receptor (Wilkins y Frost, 2002).

Los pilis reconocen a la célula receptora y establecen el contacto por retracción, existiendo sistemas sin esta propiedad, y al igual que Gram positivas necesitan colisionar para aparearse de forma estable. La SA reconoce el ácido lipoteicoico del receptor gracias a que forma una película en la superficie del donante (Wilkins y Frost, 2002). Es interesante mencionar que en enterococos la producción de SA es inducida en respuesta a péptidos hidrofóbicos sintetizados por la bacteria receptora frente a condiciones medioambientales y en este contexto, se ha descrito agregación en ausencia de feromonas como respuesta a concentraciones sub-inhedorias de antimicrobianos (Wu *et al.*, 1999).

El proceso puede transferir una variedad de entidades genéticas como transposones conjugativos e integrones (incluidos en plasmidos conjugativos o movilizables) e incluso la transferencia de grandes segmentos genéticos (Wilkins y Frost, 2002).

Los movilizables sólo codifican los genes del *relaxosoma* y no los correspondientes al poro conjugativo (*transferosoma*), en consecuencia, deben movilizarse junto a otros elementos conjugativos en un mismo evento, aprovechando el puente intercelular generado por éstos

(Salyers *et al.*, 1995; Wilkins y Frost, 2002). Los **transposones conjugativos** son elementos auto-transmisibles incorporados en el genoma con características únicas en sus mecanismos de escisión e integración, esenciales para su transferencia. Su *escisionasa (Xis)* corta cada extremo del elemento dejando *secuencias de acoplamiento*, que se unen covalentemente para formar un *intermediario circular* (transferible intacto o como una estructura monocatenaria), mientras que la *integrasa (Int)* corta e incorpora las secuencias de acoplamiento al sitio blanco. Estos elementos a diferencia de los plásmidos no muestran incompatibilidad, sino que poseen un número limitado de sitios blanco (Salyers *et al.*, 1995; Wilkins y Frost, 2002).

Los **integrones** son unidades genéticas móviles que poseen en sus extremos secuencias altamente conservadas que abrazan una región variable en la que se insertan casetes génicos. En el extremo 5' se encuentra codificada la *DNA integrasa*, enzima responsable de la integración sitio-específica de este elemento en el DNA bacteriano, determinando según sus características cuatro clases de integrones (I-IV). En el extremo 3' se encuentra codificado el gen **qacE** o su variante defectuosa **qacE Δ 1**. Estos elementos son capaces de incorporar varias unidades génicas e inducir su expresión conjunta a modo de unidad transcripcional (operón). Esto último determina que el elemento posea distintas longitudes y codifique distintos fenotipos, según el número y naturaleza de los genes insertados (Stokes y Hall, 1989; Paulsen *et al.*, 1993).

3.4. Mecanismos de resistencia a tóxicos exógenos:

Se describen diversos mecanismos responsables de la resistencia observada en bacterias, siendo elementos inherentes de una especie bacteriana, o bien, adquiridos durante su adaptación al medio en el que viven. Esto último, se asocia principalmente a la selección y expansión de clones portadores de mutaciones ventajosas.

Impermeabilidad o exclusión intrínseca: La pared celular y la membrana citoplasmática actúan como barreras de permeabilidad reducida, afectando el ingreso de una gran variedad de compuestos gracias a sus características físico-químicas, por ejemplo, la elevada lipofilidad de la pared celular del género *Mycobacterium* y la presencia de porinas pequeñas en *P. Aeruginosa* (Jenkinson, 1996).

Modificación o sobreproducción de la molécula objetivo: Mutaciones en genes codificadores, promotores o supresores entregan un fenotipo de resistencia. Esto se ha observado para tetraciclinas, quinolonas, metilicina, macrólidos, vancomicina, isoniazida y

triclosán -por objetivos moleculares modificados- y resistencia a β -lactámicos -por sobreproducción de β -lactamasas (gen *bla_{TEM}*)- (Poole, 2002; Cabrera *et al.*, 2007).

Inactivación enzimática: Actualmente existen cinco clases de β -lactamasas (A-D y de espectro extendido (β LEE)) y tres clases de aminoglicosidasas (O-fosfo, O-/3'-adenil y 6'-N-acetil **transferasas**) (Sekiguchi *et al.*, 2005).

Vías alternativas de metabolismo: Se ha descrito en cepas resistentes a sulfas y trimetropim, la utilización de una vía alternativa de metabolismo intermediario para continuar la producción de ácido fólico a partir del ácido paraaminobenzóico (PABA) (Cabrera *et al.*, 2007).

Eflujo activo: Es un mecanismo común de resistencia a antibióticos y biocidas en la que participan proteínas que realizan la extrusión de compuestos nocivos -que ya han ingresado a la célula- utilizando energía obtenida de la "fuerza protón motriz" (FPM) -derivada de la gradiente transmembrana de protones-, y de la hidrólisis del ATP (adenosina tri-fosfato) (Levy, 2002; Poole, 2005).

3.5.- Bombas de eflujo y su impacto en el control de infecciones nosocomiales:

Corresponden al mecanismo más importante de resistencia a antisépticos y desinfectantes. Las bombas de eflujo se caracterizan por acomodar y expulsar una gran variedad de sustancias químicas (Cuadros 4 y 5). Sin embargo, existen excepciones representadas por bombas específicas para un grupo de antimicrobianos (macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol) (Putman *et al.*, 2000).

La gran mayoría de los sistemas de eflujo identificados y caracterizados son transportadores secundarios, es decir, utilizan la FPM para mecanizar la expulsión, y dependiendo de su tamaño, similitud en secuencia de aminoácidos y estructura se clasifican en cuatro familias; la MFS (“*major facilitator superfamily*”) y las familias SMR (“*small multidrug resistance*”), RND (“*resistance/nodulation/cell division*”) y MATE (“*multidrug and toxic compound extrusion*”). De ellas, las dos primeras son las más importantes epidemiológicamente, pues son codificadas en elementos genéticos móviles. En cambio, las dos últimas lo hacen en el cromosoma, siendo difícilmente transferibles (Jenkinson, 1996; Davidson *et al.*, 2008).

Existe una quinta familia que, a diferencia de las anteriores, acopla la energía obtenida de la hidrólisis del ATP al proceso de expulsión (transportadores primarios), motivo por el cual es denominada superfamilia de sistemas ABC (“*ATP binding cassettes*”) codificadas principalmente en el cromosoma (Lubelski *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2008).

Las características más importantes se resumen a continuación:

Superfamilia MF: funcionan como sistema de contra-transporte, en el que la proteína toma un protón (H^+) desde el medio extracelular, mientras expelle un complejo formado por la droga y un catión. Su conformación primaria consta de alrededor de 400 residuos aminoacídicos, determinando dos grupos, de 12 y 14 α -hélices como dominios transmembrana (DTM). A menudo se ubican en plasmidos grandes (de longitudes mayores a 20 kb.), otorgando resistencia a agentes catiónicos (Jenkinson, 1996; Paulsen *et al.*, 1998; Vali *et al.* 2008).

Familia SMR: corresponde a la familia de proteínas de eflujo más pequeñas que existe, constituidas por aproximadamente 100 residuos aminoacídicos y 4 α -hélices DTM. Dentro de los determinantes más importantes podemos mencionar los genes ***qac C-J***, algunos de los cuales se ubican en integrones clase I (*qacE/E Δ 1*), lo que les ha permitido diseminarse ampliamente entre bacterias Gram negativas. Generalmente se localizan en plasmidos de

tamaño inferior a 3 kb.) (Paulsen *et al.*, 1993; Jenkinson, 1996; Bjorland *et al.*, 2001; Noguchi *et al.*, 2005; Vali *et al.*, 2008). Debido a su pequeño tamaño, se ha propuesto que funcionan como complejos homo-oligoméricos (Putman *et al.*, 2000).

Familia MATE: se caracterizan por utilizar iones Na^+ en el contra-transporte. Su estructura terciaria está compuesta por 12 α -hélices como DTM. Entregan resistencia principalmente frente a colorantes, fluoroquinolonas hidrofílicas y aminoglicósidos (Putman *et al.*, 2000).

Familia RND: posee una proteína tipo con función acopladora-adaptadora constituida por aproximadamente 900 aminoácidos y 12 DTM, que se asocia a una proteína de la familia MF (primer componente) y una porina de membrana externa (tercer componente), dando origen a un **sistema tripartito constitutivo**, que se organiza desde la membrana citoplasmática, atravesando el espacio periplásmico, hasta la membrana externa. Los tres componentes se encuentran codificados en su operón respectivo, siendo los mayores responsables de la resistencia intrínseca y adquirida de bacterias Gram negativas (Cuadros 4 y 5) (Jenkinson, 1996; Putman *et al.*, 2000; Poole, 2005).

Superfamilia de sistemas tipo ABC: corresponden a sistemas que comparten un dominio de hidrólisis de ATP altamente conservado –casete de unión-. Acoplan la energía derivada de la hidrólisis del ATP a una gran variedad de procesos fisiológicos esenciales, describiéndose tres categorías funcionales; los exportadores (clase I), los no involucrados en transporte (clase II) y los importadores (clase III). Los importadores y exportadores comparten su organización estructural, compuesta de 2 DTM (de seis α -hélices) y 2 dominios hidrofílicos de unión a nucleótidos (DBN) que portan el casete de unión a ATP responsable de la hidrólisis del ATP (Lubelski *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2008). Las bombas se disponen como un homodímero o heterodímero según la semejanza en la estructura primaria de sus subunidades (Poole, 2005).

Se describe un dominio de unión a sustratos conservado en transportadores de las familias ABC y RND, indicando que estos transportadores posiblemente han surgido como un mecanismo de defensa natural a compuestos tóxicos presentes en el medio ambiente, y la presión ambiental, conduce a la selección de clones favorecidos en su expresión, apoyando la hipótesis de que estas bombas asociadas ahora a resistencia a agentes terapéuticos se originaron a partir de mecanismos primitivos de supervivencia que les permitía a las bacterias eliminar compuestos tóxicos derivados de su metabolismo o del ambiente extremo en el que vivían (Miller y Sulavick, 1996; Bloomfield, 2002; Poole, 2005). Efectivamente, al considerarla

como una respuesta general a condiciones ambientales adversas, es importante mencionar que otras situaciones, y no sólo la exposición a biocidas, promueven su sobre-expresión (McMurry *et al.*, 1998; Bloomfield, 2002).

La gran cantidad de genes codificados constitutivamente en el cromosoma explica la resistencia intrínseca observada en estas especies, por mutaciones en regiones promotoras o supresoras, que conducen a la sobre-expresión y adquisición de resistencia múltiple, que en este caso particular, es difícilmente transferible (cuadro 4 y 5). La exposición sostenida a concentraciones sub-letales de compuestos tóxicos se ha propuesto como el factor más importante en la inducción de mutaciones, la selección y expansión clonal de genotipos resistentes (Bloomfield, 2002; Gilbert *et al.*, 2002; Stickler, 2002). Algunos biocidas tendrían la capacidad de seleccionar mutantes de sensibilidad reducida a antimicrobianos que comparten su molécula objetivo (Silver y Wendt, 1967; Cookson *et al.*, 1991; McMurry y Levy, 1998; McMurry *et al.*, 1999; Bloomfield, 2002).

Cuadro 4: Genes de resistencia a biocidas en bacterias nosocomiales, sistemas proteicos y sustratos involucrados (actualizado de Poole, 2005).

Bacteria	Gen, Localización	Familia Proteica	Sustratos	Inductor ¹	Ref		
<i>S. aureus</i>	smr (qac C/D)	P	SMR	QAC, ACR, CTM.	SUL	8, 17, 29 3 16	
	qac EΔ1	IC1	SMR	QAC.			
	qac G	P	SMR	QAC.			
	qac H	P	SMR	QAC.			
	qac J	P	SMR	QAC.			
	qac A/B	P	MF ₁₄ -DMT	QAC, CHX, ACR, DA, BG, NOR, QAC, CTM			17, 29
	norA	C	MF ₁₂ -TMD	NOR, CTM.			2
	norB	C	MF	QAC, CTM.			1
	norC	C	MF	QAC, MOXI, ESPR.			21
	mdeA	C	MF	GCC, QAC.			21
	sdrM	C	MF	NOR, ACR, BE.			20
mepA	C	MATE	CHX, DA, QAC, CTM.	19			
sepA	C	?	ACR, BE.	11, 19			
<i>E. faecalis</i>	emeA	C	MATE	NOR, DAPI, BE, CB, ACR.	12,13		
<i>E. faecium</i>	efrAB	C	ABC	FQ, DOX, ACR, DAPI, DAU, DXR.	22		
<i>P. aeruginosa</i>	mexAB-oprM	C	RND	FQ, ERY, ROX, TET, GCC, βL, AG, TCS.	QAC, CR, BE, R6G, TCS	7	
	mexCD-oprJ	C	RND	FQ, GCC, TCS.			
	mexEF-oprN	C	RND	FQ, GCC, CAF, TCS.			
	mexJK-oprM	C	RND	FQ, GCC, TCS.			
	mexXY-oprM	C	RND	FQ, GCC, AG, TCS.			
	qac G	P	SMR	QAC.			
	qac E/EΔ1	IC1	SMR	QAC.			SUL EΔ1).
	emrE _{Pae}	C	SMR	FQ, ACR.			3 28
	pmpM	C	MATE	FQ, CB, ACR, BE.			15
<i>E. coli</i>	acrAB-toIC	C	RND	OXZ, βL, MLK, QAC, FEN, TCS.	APIN, SAL, RL TCS.	4, 5, 9.	
	acrEF-toIC	C	RND	OXZ, QAC, TCS, MLK			
	yhiUV-toIC	C	RND	CB, BE.			6.
	emrB	P	MF ₁₄ -TMD	CB, BE.			6.
	emrD	P	MF ₁₂ -TMD	CB, BE.			28.
	emrE	P	SMR	CB, BE, AG.			3.
	qac E/EΔ1	IC1	SMR	QAC.			28.
	sugE	C	SMR	FQ, ACR, BE, CB.			
	silABCh	P	RND	QAC, Ag ²⁺ .			
	mdfA (cmr)	C	MF ₁₂ -TMD	CB, TET, CAF, ERY, R6G.			24.
ydhE (norE)	C	MATE	NOR, DOX, DAU, TRIM, KAN, ACR, B.	6, 14			

¹ Sustancias químicas de distinta naturaleza presentes en el medio ambiente que producen sobre-expresión génica y la consiguiente selección de los clones portadores.

Cuadro 5: Genes de resistencia a biocidas en bacterias nosocomiales, sistemas proteicos y sustratos involucrados (actualizado de Poole, 2005).

Bacteria	Gen, Localización		Familia Proteica	Sustratos	Inductor ²	Ref.
<i>K. pneumoniae</i>	qacE	IC1	SMR	QAC.	SUL.	3
	qacEΔ1	IC1	SMR	QAC.		3, 16
	silABC	C	RND	Ag ²⁺ .		26
	acrAB-kocC	C	RND	CLX, ERY, CB, BE.		18
	kmrA	C	MF	NOR, KAN, GEN, ACR, MV.	No inducible	24
	kdeA	C	MF	CAF, NOR, ACR, BE.		10
	cepA	C	?	CHX.		
<i>S. marcescens</i>	sdeXY	C	RND	TCS, QAC, CHX.	TCS.	27
	silABC	P	RND	Ag ²⁺ .		
	silP	P	ABC	Ag ²⁺ .		
	smdAB	C	ABC	NOR, TET, DAPI.		27
	ssmE	C	SMR	FQ, ACR, MV, CHX.		28
	smfY	C	MF	NOR, CB, ACR, BE, DAPI.		25
<i>E. cloacae</i>	qac F	P	SMR	QAC.	No inducible	23
	acrAB-tolC	C	RND	TGC, ERY, CLIN, TET, CAF, LNZ, NOR, ACNX, TLT, NOV, RFP		

P: PLASMIDO; C: CROMOSOMA; IC1: INTEGRONES CLASE I.

ACNX: ácido nalidixico; **ACR:** acriflavina/acrinol; **Ag²⁺:** plata; **AG:** aminoglicósidos; **APIN:** aceite de pino;; **BE:** bromuro de etidio; **BG:** biguanidinas; **C:** cromosomal; **CAF:** cloranfenicol; **CB:** cloruro de benzalconio; **CHX:** clorhexidina; **CIP:** ciprofloxacino; **CLIN:** clindamicina; **CTM:** ceftriaxona; **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol; **DA:** diamidinas; **DAU:** daunorubicina; **DOX:** doxiciclina; **DXR:** doxorubicina; **ERY:** eritromicina; **FEN:** fenólicos; **FQ:** fluoroquinolonas (CIP y NOR); **GCC:** gliciliclinas; **GEN:** gentamicina; **IC1:** integrón clase 1; **KAN:** kanamicina; **LNZ:** linezolid; **MLAS:** macrólidos, lincosamidas y estreptograminas tipo A; **MLK:** macrólidos, lincosamidas y ketólidos; **MOXI:** moxifloxacino; **MV:** metil-viologen; **NOR:** norfloxacino; **NOV:** novobiocina; **OXZ:** oxazolidonas; **QAC:** derivados de amonio cuaternario; **RFP:** rifampin; **RL:** radicales libres; **ROX:** roxitromicina; **R6G:** rodamina 6 G; **SAL:** salicilato; **ESPR:** esparfloxacino; **SUL:** sulfonamidas; **TCS:** triclosán; **TGC:** tigeciclina; **TET:** tetraciclina; **TLT:** telitromicina; **TRIM:** trimetoprim; **βL:** betalactámicos.

Referencias: 1 : Yamamoto *et al.*, 1988; 2 : Cookson *et al.*, 1991; 3 : Paulsen *et al.*, 1993; 4 : Miller y Sulavick, 1996; 5 : McMurry *et al.*, 1998; 6 : Morita *et al.*, 1998; 7 : Chuanchuen *et al.*, 2000; 8 : Bjorland *et al.*, 2001; 9 : Bloomfield, 2002; 10 : Fang *et al.*, 2002; 11 : Narui *et al.*, 2002 ; 12: Lee *et al.*, 2003a; 13 : Lee *et al.*, 2003b; 14 : Xu *et al.*, 2003 ; 15 : He *et al.*, 2004; 16 : Wang *et al.*, 2004; 17 : Noguchi *et al.*, 2005; 18 : Ogawa *et al.*, 2006; 19 : Tsuchiya *et al.*, 2006; 20 : Yamada *et al.*, 2006; 21 : DeMarco *et al.*, 2007; 22 : Lubelski *et al.*, 2007; 23 : Pérez *et al.*, 2007; 24 : Ping *et al.*, 2007; 25 : Shahcheraghi *et al.*, 2007; 26 : Li *et al.*, 2008; 27 : Matsuo *et al.*, 2008; 28 : Minato *et al.*, 2008; 29 : Vali *et al.*, 2008 (Si no se indica referencia corresponde a Poole, 2005).

² Sustancias químicas de distinta naturaleza presentes en el medio ambiente que producen sobre-expresión génica y la consiguiente selección de los clones portadores.

4.- SEGUIMIENTO DE BACTERIAS NOSOCOMIALES Y SUS CARACTERÍSTICAS DE RESISTENCIA.

4.1. Vigilancia epidemiológica de resistencia bacteriana:

La Organización Panamericana de Salud (OPS) en enero de 1999 elaboró un programa destinado a países de Latinoamérica con el fin de crear una base de datos actualizada para determinar la magnitud y repercusión de la resistencia a antimicrobianos, proponiendo medidas eficaces y dinámicas de control, apoyándose en registro de datos precisos y procedimientos diagnósticos estandarizados por laboratorios de referencia nacional e internacional (OPS, 1999).

El proyecto para el 2005 incorporó la vigilancia de varias especies de interés médico, dentro de las cuales podemos mencionar *Campylobacter spp.*, *E. coli* uropatógena, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae* O1 y O139 (enterobacterias), *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* y β -hemolítico (patógenos adquiridos en la comunidad); junto a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *E. faecium*, *E. faecalis* y otros enterococos, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* y *Proteus spp.* (patógenos nosocomiales) (OPS, 2005).

Pese a esto, el proyecto no contempla el seguimiento de la resistencia bacteriana a antisépticos y desinfectantes, pues aún no se considera un problema que amenace directamente la salud pública, debido a que la mayoría de los casos descritos involucran una susceptibilidad reducida sólo a concentraciones sub-letales y no a concentraciones de trabajo. Este último fenómeno se define como **tolerancia** más que resistencia. Sin embargo, *S. marcescens* y *P. aeruginosa* se describen **resistentes** a clorhexidina y triclosán, poniendo de manifiesto la necesidad de vigilar este fenómeno para limitar eventos que reduzcan su efectividad y la de otros biocidas en el futuro (Stickler, 2002; Noguchi et al., 2005; Vali et al., 2008).

4.2. Técnicas para determinar tolerancia o resistencia a biocidas:

Los antisépticos y desinfectantes no poseen técnicas estandarizadas para determinar su potencial bactericida frente a una cepa particular o especie de interés, por ello algunos autores han utilizado técnicas estandarizadas para antimicrobianos con el fin de determinar la susceptibilidad *in vitro* de ciertas especies bacterianas, la **concentración mínima inhibitoria (CMI)** y la **concentración mínima bactericida (CMB)**. Esta última, es preferida por ser más representativa de la verdadera actividad letal de un germicida, aunque puede estar sesgada debido a las propiedades físico-químicas en las que se realiza el ensayo y la naturaleza química del compuesto probado (García y Pelaz, 2001).

La CMI expresada en partes por millón (ppm) o mg/mL, corresponde a la menor concentración de biocida en la que no se observa turbidez –indicadora de crecimiento bacteriano-, siendo equiparable a la del tubo control. Una vez obtenida la CMI puede estimarse la CMB, definida como la menor concentración de un agente capaz de matar al 99,9% de bacterias de un inóculo. Luego de la prueba de la CMI se obtiene 50 µL de cada tubo en el que no se observa turbidez y se siembra en placas de agar sangre, incubándose a 37° C durante la noche junto con una placa con 50 µL del inóculo inicial. Finalmente, se cuenta el número de colonias por placa, y aquella que posee una disminución de 100 veces a la correspondiente del primer inóculo o UFC inferior al 0,1%, es registrada como la CMB (García y Pelaz, 2001; Qaiyumi, 2007).

El *European Committee for Standardization* ha propuesto la prueba de **determinación de actividad bactericida**, que se puede utilizar como complemento a las técnicas previamente mencionadas. Considera como efecto bactericida una disminución de al menos 4 log en el número inicial de UFC/mL tras exposiciones de 30 minutos, 1, 6 y 24 horas a distintas concentraciones de biocida –incluye la CMI, CMB, y concentraciones de uso recomendadas para tratamientos continuos y de choque- (García y Pelaz, 2001).

4.3. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

El estudio y seguimiento de genes de resistencia ha sido posible gracias a la implementación de esta técnica, que consiste en la síntesis *in vitro* de una secuencia genética de interés gracias al uso de cebadores específicos (de oligonucleótidos) que reconocen secuencias que flanquean el segmento a amplificar. Esto se logró mediante el descubrimiento y aplicación de la *Taq* polimerasa, enzima de la bacteria *Thermophilus aquaticus* capaz de incorporar nucleótidos libres al extremo 3' del cebador, generando copias de la secuencia blanco en cantidad exponencial, en cortos lapsos de tiempo y a temperaturas elevadas. Se caracteriza por su termoestabilidad, alta procesividad (agrega una gran cantidad de nucleótidos antes de desprenderse) y alta fidelidad (Mullis y Faloona, 1987).

Realizar la técnica involucra repetir un ciclo -de tiempos y temperaturas específicas para cada etapa de la reacción- una cantidad suficiente de veces para obtener un producto visible mediante técnicas adicionales. En la primera etapa (denaturación) la mezcla de reacción se somete a altas temperaturas con el fin de romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las hebras complementarias de ADN. Durante la segunda etapa, la hibridación, los cebadores se unen a secuencias complementarias para que, en la tercera etapa, de elongación o polimerización, la DNA-polimerasa realice la extensión de la secuencia blanco a partir de ellos (Smith, 2002).

Luego de la amplificación los productos deben ser separados para ser visualizados utilizando la técnica de electroforesis, que consiste en la separación de las moléculas de ADN gracias a su carga eléctrica negativa y peso molecular. Son depositadas en un gel de poliacrilamida o agarosa inmerso en una solución buffer, que es sometido a un campo eléctrico. La concentración del gel determina la densidad de la solución, y por tanto, la velocidad con la que se desplazan las moléculas de interés. Efectivamente, mientras menor el tamaño de los productos de la reacción, más concentrado debe utilizarse el gel, de esta forma, para PCR diagnóstico generalmente se utilizan concentraciones de agarosa al 2% (Danchin y Yuen, 2002; Pennington, 2002).

4.1.1. Usos epidemiológicos de genética molecular: tipificación.

Las infecciones nosocomiales son causadas en su mayoría por especies bacterianas que son residentes habituales de sus hospederos, aislándose comúnmente desde individuos sanos como parte de su flora normal. Durante un brote, el sólo aislamiento e identificación de la especie bacteriana no entrega información útil para determinar el origen y las vías por las cuales las cepas epidémicas de interés han tenido acceso a los pacientes, es necesario identificar *tipos* con el fin de establecer relaciones epidemiológicas que permitan tomar medidas de control en un proceso dinámico de información. La genética molecular entrega herramientas indispensables para afrontar este desafío, las distintas metodologías se basan en diferenciar *tipos* a nivel intraespecífico según la diferencia o **polimorfismo genético** detectable entre distintos clones bacterianos, debido a procesos de mutación y recombinación genética propio de poblaciones bacterianas (Pennington, 2002).

El ADN genómico a diferencia del plasmidial necesita un procesamiento previo para usarlo en tipificación, puede ser cortado mediante enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos analizados directamente por electroforesis –las enzimas reconocen y cortan secuencias específicas, de este modo, la variedad de patrones en tamaño y cantidad de bandas representa la variabilidad genómica dentro de una especie-. Como alternativa, regiones específicas del genoma pueden ser amplificadas mediante PCR y secuenciadas para detectar polimorfismo (Pennington, 2002).

Existen enzimas que reconocen secuencias escasas y generan una cantidad convenientemente menor de fragmentos, pero de gran tamaño (que hacen más simple el análisis de patrones de banda). La Electroforesis de Campo Pulsado en Gel (**PFGE**) hace posible separar fragmentos de tamaño superior a 50 kb gracias a la aplicación de campos eléctricos desiguales, alternados y de orientación perpendicular, siendo actualmente la técnica más aceptada para tipificar aislados alrededor del mundo, debido a que la metodología es de fácil implementación, reproducible, sirve para la gran mayoría de patógenos y tiene un alto poder de discriminación (Pennington, 2002).

Otras técnicas como la **ribotipificación**, **fagotipificación** y **serotipificación** se han utilizado en estudios epidemiológicos, pero sólo la primera utiliza conceptos de genética molecular (sondas de DNA marcadoras que hibridan con los genes codificadores de los ARN ribosomales 16S y 23S), pero debido a la complejidad de la hibridación y al poco grado de

polimorfismo de los genes, es utilizada sólo para algunos patógenos. Las últimas dos técnicas son de gran utilidad, especialmente en enterobacterias y otros patógenos (Pennington, 2002).

La detección de los genes de resistencia a antimicrobianos y biocidas en las cepas epidémicas permite establecer su relación con elementos genéticos móviles y la relevancia epidemiológica que este fenómeno posee, considerando los mecanismos de recombinación genética existentes (Salyers *et al.*, 1995). En la actualidad, diversos investigadores han realizado seguimiento de los genes de resistencia a biocidas, determinando que las familias MFS y SMR poseen mayor relevancia epidemiológica al estar asociadas a plásmidos, siendo los genes *qacA/qacB* y *smr (qacC/D)* los detectados con mayor frecuencia (Bjorland *et al.*, 2001; Bjorland *et al.*, 2005; Noguchi *et al.*, 2005; Vali *et al.*, 2008).

En consideración de lo anteriormente planteado, y el riesgo latente de transmisión entre humanos y animales de bacterias, y de sus genes de resistencia, es necesario realizar estudios que esclarezcan la realidad nacional. En Chile no existen investigaciones orientadas a detectar este tipo de genes en medicina veterinaria, y los estudios realizados por el Instituto de Salud Pública (ISP) y otras entidades exponen un incremento de resistencia en antimicrobianos mediante técnicas de microbiología clásica (Pinto, 2002). Existe escasa información sobre las características genéticas de susceptibilidad a biocidas en la literatura nacional. Por tanto, para comenzar un estudio pionero en la medicina veterinaria nacional, en esta Memoria de Título se detectarán aquellos genes descritos con mayor frecuencia en el mundo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar genes de resistencia a biocidas mediante técnicas de diagnóstico molecular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detección de los genes *qacA/qacB* en bacterias nosocomiales mediante la técnica de PCR convencional.
2. Detección de los genes *qacC/D (smr)* en bacterias nosocomiales mediante la técnica de PCR convencional.
3. Proponer, si corresponde, un protocolo para el uso estratégico de biocidas en las unidades clínico veterinarias de la Universidad de Chile.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Muestras: Bacterias Gram negativas (n=32) y Gram positivas (n=48) consideradas nosocomiales (n=80), obtenidas en el Hospital Veterinaria de la Universidad de Chile (sedes Bilbao y Facultad) y caracterizadas previamente entre los años 2007 (n=51) y 2008 (n=29) que presentan un perfil de multiresistencia a antimicrobianos (**Enr:** enrofloxacino; **A:** ampicilina; **Amc:** Amoxicilina+Acido clavulánico; **Cip:** ciprofloxacino; **T:** Tetraciclina; **Sxt:** sulfa+trimetropin; **Van:** vancomicina; **D:** doxiciclina; **G:** Gentamicina; **Ox:** oxilina; **Sul:** Sulperazona. **R:** resistente; **SI:** sensibilidad intermedia; **S:** sensible. * Cepa obtenida en la sede Facultad) (Cuadros 6 a 9).

Cuadro 6: bacterias nosocomiales Gram negativas obtenidas durante el 2007 (**N = 20**) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).

Aislado	Especie	Enr	A	Amc	Cip	T	Sxt	D	G	Sul
335-m	<i>E. cloacae</i>	S	R	R	S	SI	S	SI	S	S
002-2	<i>E. cloacae</i>	S	R	R	S	S	S	SI	S	S
015-2	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
016-3	<i>E. cloacae</i>	S	S	SI	S	S	S	SI	S	S
017-3	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S
346-s	<i>E. cloacae</i>	SI	R	R	S	S	R	R	R	S
348-m	<i>E. cloacae</i>	SI	R	R	S	S	R	R	R	S
354-s	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	SI	S	R	R	S
310	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	S
020-2	<i>E. coli</i>	R	R	SI	R	R	R	R	R	S
025-2	<i>E. coli</i>	R	R	SI	R	R	R	R	R	R
026-2	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	R	SI	S	S
031-2	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S
O14*	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	R	SI	S	S
077M	<i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	S	R	R	R	S	S
325	<i>P. aeruginosa</i>	S	R	R	S	SI	R	R	S	S
322	<i>P. aeruginosa</i>	SI	R	R	S	R	R	R	S	S
323	<i>P. aeruginosa</i>	S	R	R	S	R	R	R	S	S
035-2	<i>A. baumannii</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S
314	<i>C. freundii</i>	S	R	R	S	S	R	SI	S	S

Cuadro 7: bacterias nosocomiales Gram positivas obtenidas durante el 2007 (N = 31) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).

Aislado	Especie	Enr	A	Amc	Cip	T	Stx	Van	D	G	Ox	Sul
337	<i>E. faecium</i>	S	R	R	S	S	.	S	S	S	R	R
341	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	S	R	.	S	SI	S	R	R
356-m	<i>E. faecium</i>	S	R	R	S	R	.	S	R	S	R	R
358-s	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	SI	S	.	SI	SI	S	R	R
001-3	<i>E. faecium</i>	R	R	SI	SI	R	.	S	R	S	R	R
009-2	<i>E. faecium</i>	R	R	SI	R	S	.	S	S	S	R	R
014-1	<i>E. faecium</i>	S	S	S	SI	R	.	S	SI	S	R	SI
036-1	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	SI	R	.	S	R	S	R	R
038-2	<i>E. faecium</i>	SI	S	S	SI	R	.	S	R	S	R	SI
61	<i>E. faecium</i>	R	R	SI	R	R	.	S	R	S	R	R
51	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	.	S	R	S	R	R
76	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	.	S	R	S	R	R
82	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	.	S	R	S	R	R
317	<i>E. faecium</i>	S	R	SI	SI	SI	.	S	S	S	R	R
O34*	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	SI	R	.	S	SI	S	R	R
OO1*	<i>E. faecium</i>	R	S	S	S	R	.	S	SI	S	R	SI
508-2*	<i>E. faecium</i>	R	S	S	R	R	.	S	R	S	R	SI
538s*	<i>E. faecium</i>	SI	S	S	SI	R	.	S	R	S	R	R
546s*	<i>E. faecium</i>	R	S	S	SI	S	.	S	S	S	S	S
O81*	<i>E. faecium</i>	S	S	S	S	S	.	S	S	S	R	S
O31	<i>E. durans</i>	S	S	S	S	R	.	S	R	S	R	SI
050-1	<i>E. hirae</i>	R	S	SI	SI	R	.	S	S	S	R	S
301	<i>S. intermedius</i>	R	SI	S	R	S	R	S	S	SI	SI	S
O38*	<i>S. intermedius</i>	S	R	SI	S	R	R	S	R	S	R	SI
O78-s*	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	R	S	S	SI	S	S	S
324	<i>S. kloosi</i>	R	R	SI	R	S	R	S	S	R	R	S
068-1	<i>S. kloosi</i>	S	SI	S	S	R	S	S	R	S	S	S
528*	<i>S. kloosi</i>	S	SI	S	S	S	R	S	S	S	S	S
O46*	<i>S. epidermidis</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
311	<i>M. sedentarius</i>	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
543-2*	<i>M. sendentarius</i>	S	R	SI	S	SI	S	R	S	S	R	S

Cuadro 8: bacterias nosocomiales Gram negativas obtenidas durante el 2008 (N = 12) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).

Aislado	Especie	Enr	A	Cip	T	Sxt	D	G	Sul
030-2M	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	SI	R	SI	R	R
033-2	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	S	S	SI	R	R
536*	<i>E. cloacae</i>	S	SI	S	S	S	S	S	R
516 M*	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
515 M*	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	R	S	S	R
502-1*	<i>E. cloacae</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
062 M	<i>E. cloacae</i>	SI	R	R	SI	R	R	R	R
029-2	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
031-2M	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
539*	<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
548 M*	<i>Ps. aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	R
53	<i>A. baumannii</i>	S	S	S	SI	S	S	S	R

Cuadro 9: bacterias nosocomiales Gram positivas obtenidas durante el 2008 (N = 17) y su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos (según Kirby Bauer).

Aislado	Especie	Enr	A	Cip	T	Stx	Van	D	G	Ox	Sul
083	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	.	S	R	R	R	R
085	<i>E. faecium</i>	SI	S	R	R	.	S	R	R	R	.
087	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	.	S	R	R	R	.
508 M*	<i>E. faecium</i>	R	S	SI	R	.	S	R	S	R	.
511 s*	<i>E. faecium</i>	R	SI	R	R	.	S	R	R	R	.
003-2	<i>E. faecium</i>	SI	SI	SI	R	.	S	R	S	SI	.
022-3	<i>E. faecium</i>	R	R	R	S	.	S	S	S	R	R
054	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	.	S	R	S	R	.
055	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	.	S	R	R	R	R
060	<i>E. faecium</i>	R	SI	R	S	.	S	R	S	R	.
062 S	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	.	S	R	R	R	.
029-1	<i>E. faecium</i>	R	R	R	S	.	S	S	S	R	R
537*	<i>E. faecalis</i>	SI	S	R	S	.	S	S	R	R	.
045-1	<i>E. faecalis</i>	R	S	R	SI	.	S	R	R	R	.
548 s*	<i>E. durans</i>	S	S	S	R	.	S	R	S	SI	S
028-1	<i>E. durans</i>	S	S	S	R	.	S	S	S	SI	S
530*	<i>S. kloosi</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	R	.

Obtención de ADN bacteriano:

A partir de un cultivo bacteriano de 10^6 UFC/mL se procedió a la extracción del material genómico mediante un kit comercial de extracción y purificación (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas®). Así, a 200 μ L de muestra, se le adicionaron 400 μ L de solución de lisis, se incubaron a 65° C por 5 minutos, homogenizando manualmente cada un minuto y medio. Inmediatamente después, se adicionaron 600 μ L de cloroformo (Merk®), mezclando suavemente (invirtiendo los tubos 5 veces) para a continuación centrifugar a 10.000 rpm por dos minutos (Heraus Sepatech Biofuge®). Paralelamente a la centrifugación, se preparó la solución de precipitación agregando 720 μ L de agua libre de nucleasas (Winkler®) a 80 μ L del concentrado de precipitación (10X) provisto por el kit. Una vez terminada la centrifugación se colectó la fase superior en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se le agregó 800 μ L de solución de precipitación, mezclando suavemente y centrifugando a 10.000 rpm por 2 minutos. El pellet obtenido fue disuelto en 100 μ L de una solución 1.2 M de NaCl provista por el kit. A esta mezcla se le agregó 300 μ L de etanol frío y se mantuvieron a -20°C por 10 minutos para precipitar el ADN. Luego se centrifugó a 10.000 rpm por 4 minutos, se eliminó el etanol, y el pellet obtenido se disolvió en 100 μ L de agua libre de nucleasas. Este ADN se utilizó inmediatamente para realizar la prueba de PCR o bien, se almacenó a 4°C por no más de un mes.

Mezcla de reacción de PCR:

Para lograr la mezcla de amplificación del ADN purificado, se utilizó un kit 2X PCR Master Mix (Fermentas®), que incluye la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y $MgCl_2$, del que se extrajeron 12.5 μ L que se depositaron en un tubo Eppendorf de 0.2 mL, junto a 5 μ L de cada uno de los cebadores, y 5 μ L de la muestra de ADN templado, obteniendo un volumen total de 27.5 μ L. Se procedió a su homogenización utilizando el vortex para asegurar la mezcla de los reactivos.

Partidores y protocolo de PCR:

1. **Gen *smr***: la secuencia de cebadores fue seleccionada por su alta especificidad. Amplifican segmentos de tamaño conocido de 285 pares de bases (pb), y corresponden a:

Smr-F: 5´ - ATA AGT ACT GAA GTT ATT GGA AGT - 3´ (24 bases).

Smr-R: 5´ - TTC CGA AAA TGT TTA ACG AAA CTA - 3´ (24 bases).

2. **Gen *qacA/qacB***: la secuencia de cebadores fue seleccionada por su alta especificidad. Amplifican segmentos de tamaño conocido de 361 pb, y corresponden a:

QacA/B-F: 5´ - GCA GAA AGT GCA GAG TTC G - 3´ (19 bases).

QacA/B-R: 5´ - CCA GTC CAA TCA TGC CTG - 3´ (18 bases).

Los protocolos de reacción para cada par de cebadores se resumen en el anexo 1, basados en aquellos estandarizados por Bjorland *et al.* (2001), y Noguchi *et al.* (2005).

Visualización de los productos del PCR:

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2 % en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas ®), el cual se sometió luego de la electroforesis, a inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo ®). El producto de PCR se mezcló con 6 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 chequear 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 por 90 minutos. Se utilizó 5 µL de Favorgen 100 bp DNA ladder (Favorgen ®) como marcador de tamaño molecular, que contiene secuencias de ADN entre 100 y 3000 pb para facilitar la detección de los fragmentos amplificados. Una vez finalizada, el gel ya teñido con bromuro de etidio fue visualizado en el transiluminador ultravioleta (Transiluminator UVP ®), y fotografiado con película Polaroid ®.

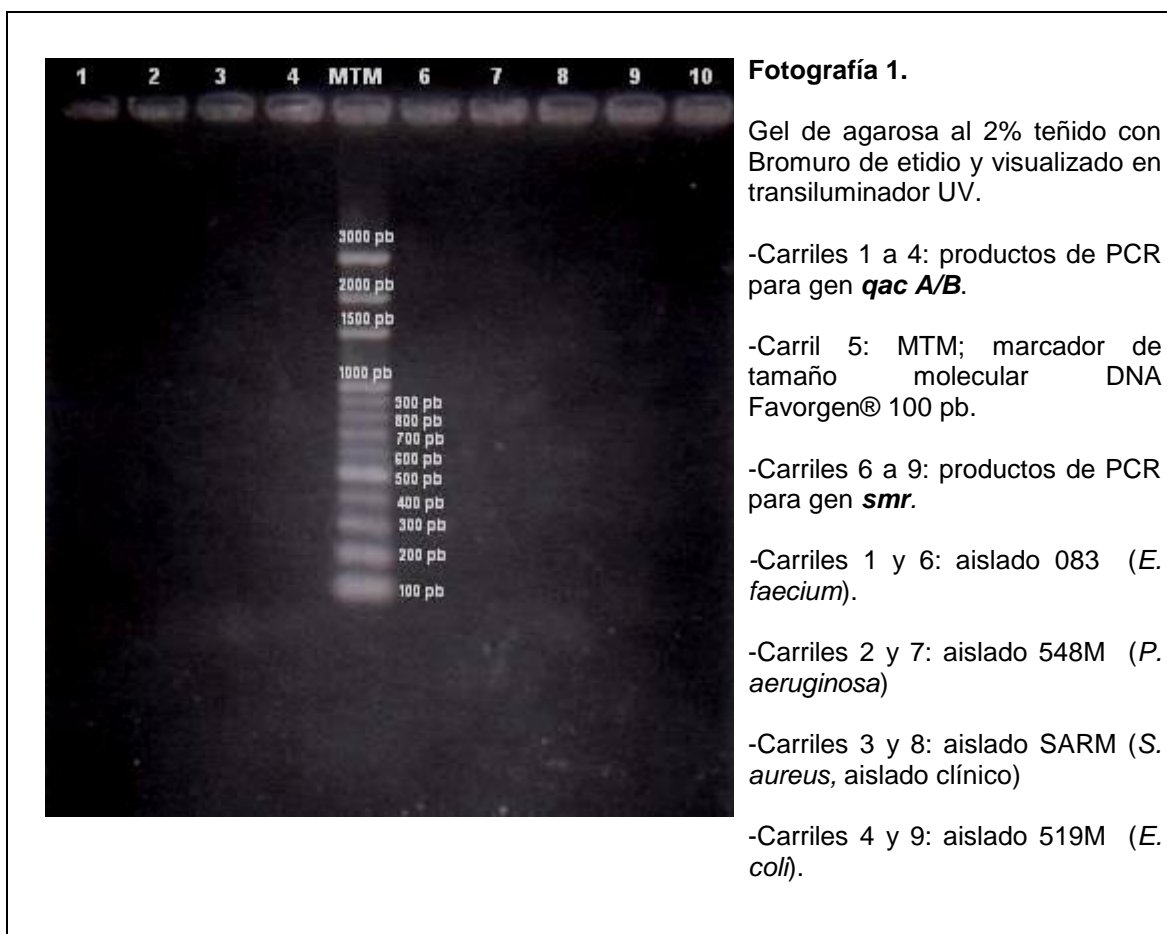
Verificación de Normas de Bioseguridad adoptadas en las unidades clínico-veterinarias de la Universidad, y mejoramiento de los protocolos de uso estratégico de biocidas:

Si la detección de alguno de los cuatro genes resultase positiva, se procedería a visitar las unidades clínicas de la Universidad (sedes Bilbao y Facultad) para comprobar en terreno cuales, dónde, en que concentración, en que procedimiento y con que protocolo se utilizan los agentes desinfectantes y antisépticos, ajustando su uso, si corresponde, a las recomendaciones de organizaciones internacionales (OMS, OPS, etc.) y expertos en la materia, utilizando información atinente con el objeto de minimizar la transmisión de agentes nosocomiales y otros infecciosos en la práctica médica.

RESULTADOS

1. Detección de genes que otorgan resistencia a biocidas:

Al realizar la técnica de PCR convencional a las muestras de ADN extraído de las 80 cepas aisladas y caracterizadas como multiresistentes a distintos antimicrobianos según el método de determinación de sensibilidad de Kirby-Bauer, ninguna resultó positiva a la detección de los genes *qacA*, *qacB*, *qacC* y *qacD* (fotografía 1).



En la fotografía 1 -representativa de 8 electroforesis negativas- no se observan bandas o fragmentos de ADN de un tamaño alrededor de 285 pares de bases (gen *smr*). De igual forma, no se aprecian bandas o fragmentos de ADN de tamaño compatible con el amplicón del gen *qacA/qacB* (361 pares de bases).

2. Protocolo para el uso estratégico de antisépticos y desinfectantes:

Debido a que los resultados indican que no se logró obtener amplicones utilizando la técnica convencional de PCR a partir de muestras de ADN procedentes de las muestras del estudio, en diciembre 2008 se realizó una nueva visita a la sede Bilbao, en la cual se obtuvo 16 muestras con tómulas estériles desde aspersores de biocidas (n = 6), esponjas y cepillos de manos (n = 2), lavamanos de cirugía (n = 2) y de sala de hospitalización (n = 2), dispensadores de clorhexidina (n = 2) y de jabón yodado (n = 2), las que se sembraron dentro de las 4 horas de extraídas en **caldo tripticasa soya** (medio de cultivo enriquecido), no observándose crecimiento a las 24, 48 ni 72 horas de incubación a 37° C.

Aunque ambos resultados fueron negativos, se ha propuesto un protocolo para el uso estratégico de antisépticos y desinfectantes en los anexos 5 y 6.

DISCUSIÓN

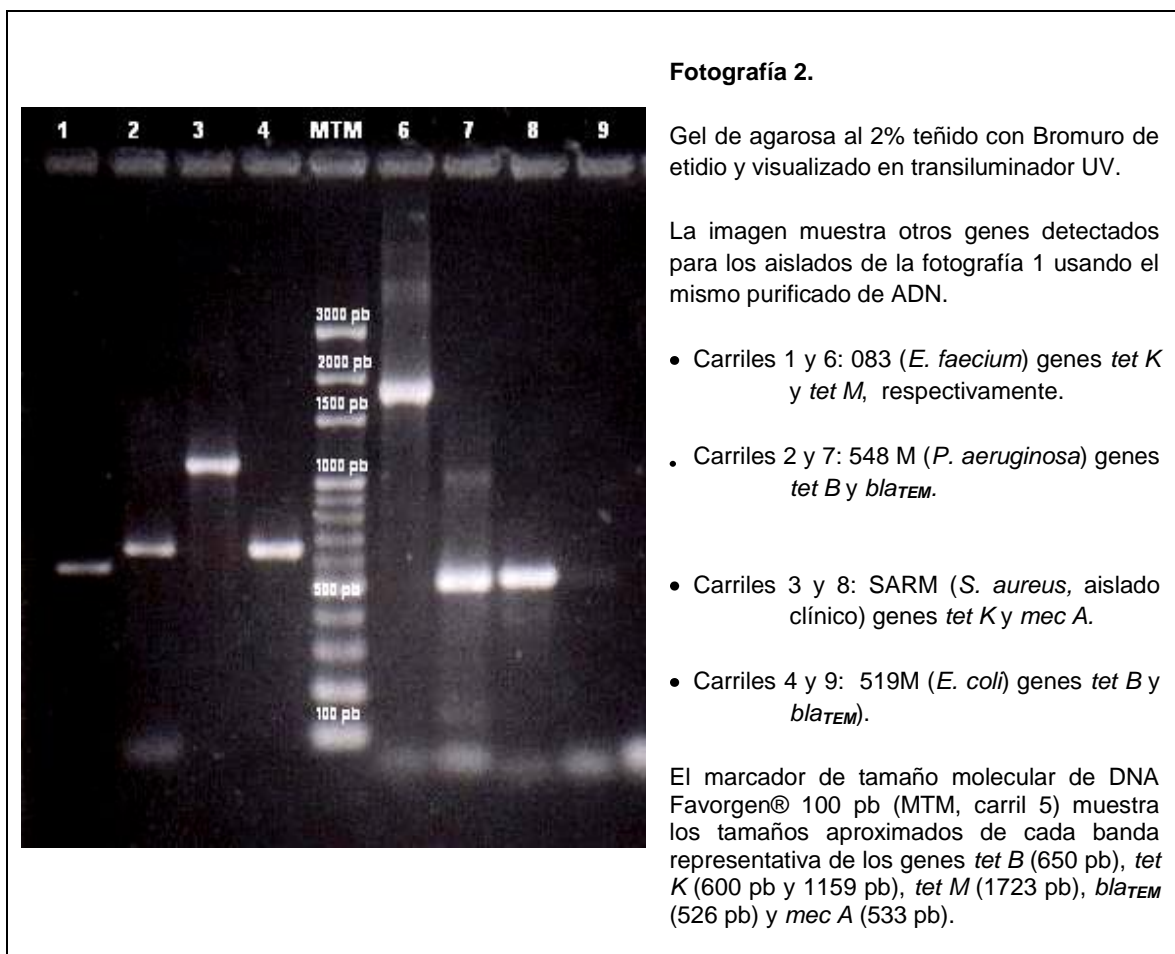
En primer lugar, la ausencia de los cuatro genes en las 80 cepas caracterizadas no es un resultado del todo inesperado, pues estos determinantes de resistencia son descritos con mayor frecuencia en la especie *S. aureus* (Cuadro 4), no siendo exclusivos de ella. Existe una gran variedad de genes *qac* (*qacA-qacJ*) que se describen tanto en Gram positivas como negativas (Cuadros 4 y 5). En estas últimas, los determinantes con mayor relevancia epidemiológica corresponden a *qacE* y *qacEΔ1*, debido a su asociación con integrones de la clase I. Sin embargo, *qac A/B* y *qacC/D* se han descrito con menor frecuencia en especies Gram negativas, incluyendo a aquellas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. syringae*, *P. mendocina*), *Escherichia*, *Enterobacter* y *Serratia*, además de géneros Gram positivos *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Bacillus*, destacando el importante rol fisiológico, diferente de resistencia, que cumplen estas bombas en la naturaleza.

El resultado de este trabajo corrobora la escasa frecuencia de estos genes en las enterobacterias y *P. aeruginosa*, aunque este resultado se encuentra sujeto a un margen de error derivado del proceso de muestreo, en el que pueden haberse excluido aquellas colonias que poseían alguno de los determinantes, debido al inmenso tamaño de la población bacteriana, tanto en el hospital como en la expansión clonal durante su cultivo en laboratorio.

En segundo lugar, es importante considerar que estos genes se ubican en plásmidos, elementos extracromosomales que poseen características intrínsecas de estabilidad y heredabilidad según distintas condiciones ambientales, de esta forma, durante el crecimiento en condiciones de laboratorio y en ausencia de presión selectiva (que le entregue ventaja a los clones que los poseen) se transforman en un costo para la célula bacteriana, determinando que aquellas células que carecen de ellos posean tiempos de generación más breves, y por tanto, crezcan a un ritmo más acelerado, desplazando a la población portadora. Algunos autores (Noguchi *et al.*, 2005; Vali *et al.*, 2008) de forma previa a la detección de los genes de resistencia sometieron aislados a pruebas de sensibilidad a biocidas (lo que puede actuar a manera de presión selectiva, favoreciendo a los portadores).

En tercer lugar, si bien durante las experiencias no se dispuso de un control positivo que indicara el funcionamiento correcto de la reacción, cabe destacar que el resultado negativo no se debe a fallas en el proceso de purificación del ADN, pues el mismo purificado fue utilizado para amplificar con éxito otros 7 genes (*bla_{TEM}*, *mecA*, *tetO* y *tetM*), incluyendo 3 genes de

bombas de eflujo de la familia MFS que entregan resistencia a tetraciclinas (*tetA*, *tetB* y *tetK*) (fotografía 2). Los cebadores han sido utilizados en otros estudios con éxito, y el único fenómeno de variabilidad por considerar es la concentración de magnesio y la polimerasa utilizada en las reacciones. Sin embargo, la concentración de magnesio del protocolo es la misma que incluye el Master Mix de reacción (Anexo 2). Adicionalmente, se utilizó un Master Mix coloreado cuya composición incluye otra Taq polimerasa, obteniéndose los mismos resultados (Mango Mix solución 50 mM de MgCl₂, Bioline).



En cuarto lugar, la importancia de las bombas de eflujo en medicina radica en que una bacteria puede adquirir resistencia múltiple en un solo paso, de forma inespecífica, similar a la adquisición de plasmidos de resistencia. Es importante considerar que, la ubicuidad de estas bombas entre microorganismos y el uso irracional de antibióticos y quimioterapéuticos, serán los principales factores responsables en promover el aumento de la resistencia bacteriana en el

mediano y largo plazo, no sólo a las drogas utilizadas, sino que también a otras no relacionadas y desconocidas por las bacterias, gracias a la poca especificidad de estos sistemas proteicos en el reconocimiento de sus sustratos. Por ésto, para próximos estudios sería necesario realizar la búsqueda de estos genes en aislados clínicos de SARM con el fin de obtener un control positivo para los genes *qac A-D* (descrito en la literatura como su principal vector) o en su defecto, solicitar clones de estos genes a investigadores extranjeros. Adicionalmente, para aumentar la sensibilidad de todo el procedimiento, sería interesante implementar técnicas para la determinación de susceptibilidad a biocidas catiónicos de forma previa a la detección por PCR, con el fin de ejercer una presión selectiva que mantenga los plásmidos portadores en la población de muestras.

En consecuencia, es necesario continuar este importante estudio, con la búsqueda de segmentos génicos conservados de la **integrasa** del extremo 5', junto con los genes del extremo 3', ***qacE* y *qacEΔ1*** de integrones clase I, en estos mismos aislados y en nuevos. Además, de las secuencias genéticas conservadas de los extremos 5' y 3' de integrones clase II, y de la ***transposasa/integrasa*** de transposones conjugativos clase III con el objetivo de establecer relaciones estructurales y funcionales entre estos elementos móviles, los genes de resistencia a biocidas y antimicrobianos estudiados por el proyecto, y los fenotipos observados.

Para la detección de la integrasa clase I Goldstein *et al.* (2001) estandarizó un protocolo utilizando los cebadores ***intl-F: CCT CCC GCA CGA TGA TC*** e ***intl-R: TCC ACG CAT CGT CAG GC***, mientras que Sunde y Nostrom (2006) para la amplificación de la región variable de los integrones clase I, estandarizaron un protocolo utilizando los cebadores **5'CS-F: GGC ATC CAA GCA GCA AG** y **3'CS-R: AAG CAG ACT TGA CCT GA**. Estos permiten amplificar y secuenciar la región variable para caracterizar los casetes génicos circulantes (incluidos en ellos), y su impacto en la resistencia observada en determinada población bacteriana. Sin embargo, estos autores consideran al gen *sul 1* como motivo conservado del extremo 3', por lo que la reacción deja de lado aquellos integrones de la clase I que lo reemplazan por un determinante *qacE*, pues los primeros poseen la variedad *qacEΔ1*, originada de la interrupción del gen *sul1* en la secuencia *qacE*.

Existe cierto desconocimiento acerca de la asociación entre genes de resistencia a biocidas con integrones de la clase II y transposones conjugativos, elementos genéticos móviles de gran impacto en el fenómeno de resistencia a antimicrobianos, debido a que transportan gran variedad de genes involucrados en entregar resistencia a muchos compuestos

terapéuticos de última generación, a la vez que se integran no sólo al cromosoma, sino que también a plásmidos, siendo los elementos transferibles por excelencia y una de las principales amenazas para la salud pública.

Goldstein *et al.* (2001) estandarizó la reacción utilizando cebadores para detectar la integrasa propia de integrones de la clase II (***intl2-F*: TTA TTG CTG GGA TTA GGC** e ***intl2-R*: ACG GCT ACC CTC TGT TAT C**), mientras que L'Abée-Lund y Sorum (2001) estandarizaron una reacción para detectar y caracterizar su región variable, utilizando los cebadores **5'CS-F: GAC GGC ATG CAC GAT TTG TA** y **3'CS-R: GAT GCC ATC GCA AGT ACG AG** que reconocen secuencias conservadas de los extremos e inician la amplificación de la región interna variable.

Finalmente, y como proyección de este estudio, mediante el software Vector NTI Advance™ 9.1 de Invitrogen™ se ha realizado un alineamiento de secuencias de nucleótidos (obtenidas del Genbank) para identificar las regiones más conservadas entre las variantes *qacE* y *EΔ1* (provenientes de distintas especies bacterianas (Anexo 3)), con el fin de diseñar un par de cebadores (utilizando los programas Primer3™ versión 4.0 y Netprimer™ de PREMIER Biosoft International) que reconozca secuencias conservadas comunes, permitiendo de esta forma amplificar el determinante de resistencia a biocidas *qacE/qacEΔ1*, y adicionalmente, la región variable de una población más grande de integrones, al considerar la fuente de variación previamente mencionada, utilizándolos junto a los cebadores para la integrasa descritos por Goldstein *et al.* (2001). Las secuencia y temperatura de fusión (*melting*) predicha para cada uno de los cebadores se resumen en el cuadro 10, el tamaño de banda esperado es variable pero cercano a 210 pb.

Cuadro 10: cebadores y temperatura de fusión (*melting*) predicha para cada oligonucleotido.

Nombre	Secuencia (largo)	Temperatura de <i>melting</i> (Tm)
qacE CS-F	5'- GCA ATA GTT GGC GAA GTA A -3' (19 bases)	51,52° C
qacE CS-R	5'- ATG AAG CAA CCA GGC AAT G -3' (19 bases)	56,50° C

De igual forma, para detectar (en proyectos futuros) los transposones conjugativos clase 3 (grupo de gran relevancia en resistencia a antimicrobianos), se diseñó un par de cebadores para reconocer la ***integrasa/transposasa*** propia de éstos, siguiendo el mismo

procedimiento para los cebadores de *qacE* CS (Anexo 4). Los cebadores y sus temperaturas de fusión predichas se resumen en el cuadro 11, el tamaño de banda esperado es de aproximadamente 250 pb.

Cuadro 11: cebadores y temperatura de fusión predicha para cada oligonucleotido.

Nombre	Secuencia (largo)	Temperatura de melting (T _m).
cTn3 Int CS-F	5´- AAC TTG TGG CTA CAG ACC G -3´ (19 bases)	53,06° C
cTn3 Int CS -R	5´- TCA ATA CTT CTT ACT CCT AAC TTG -3´ (24 bases)	50,97° C

Estos cebadores pueden ser utilizados junto con aquellos de genes íntimamente relacionados a estos transposones, como *tetM* o *tetQ*, para detectar y realizar un seguimiento de los casetes génicos transportados y su disposición en las secuencias internas.

Sin duda, continuar con este estudio permitirá contar con controles positivos propios, al realizar la secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos en cada una de las reacciones de PCR positivas, y de esta forma, contar con una técnica molecular de mayor robustez.

CONCLUSIONES

1. No se detectó ninguno de los genes más representativos de las familias MFS (*qacA* y *qacB*) y SMR (*qacC* y *qacD*) en las 80 muestras analizadas, obtenidas de unidades clínico veterinarias de la Universidad, procedentes tanto del Hospital Veterinario Bilbao como del Hospital de la Facultad.
2. Las concentraciones de biocidas utilizados en las unidades clínico-veterinarias de la Universidad fueron suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano de muestras tomadas directamente de los aspersores y cepillos de manos, no así en el resto de los lugares muestreados.

BIBLIOGRAFÍA

ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146: 837-839.

BJORLAND, J.; SUNDE, M.; STEINAR WAAGE, S. 2001. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 39(11): 3999-4004.

BJORLAND, J.; STEINUM, T.; KVITLÉ, B.; WAAGE, S.; SUNDE, M.; HEIR, E. 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J. Clin. Microbiol.* 43(9): 4363-4368.

BLOOMFIELD, S.F. 2002. Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. *J. Appl. Microbiol.* 92: 144S-157S.

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(2): 149-158.

CHUANCHUEN, R.; BEINLICH, K.; SCHWEIZER, H.P. Multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Abstracts of the 100th general meeting of the American Society of Microbiology. Los Angeles. (A31). 2000.

COOKSON, B.D.; BOLTON, M.C.; PLATT, J.H. 1991. Chlorhexidine Resistance in Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* or just a Elevated MIC? An In Vitro and In Vivo Assessment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35(10): 1997-2002.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GREESY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.

DANCHIN, A.; YUEN, K.Y. Bacterial Genomics in the Study of Virulence. *In: SUSSMAN, M.* Molecular Medical Microbiology. Barcelona. España. Academic press. 2002. pp. 341-353.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 847-867.

DAVIDSON, A.L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. 2008. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72(2): 317-364.

DEMARCO, C.E.; CUSHING, L.A.; FREMPONG-MANSO, E.; SEO, S.M.; JARAVAZA, T.; KAATZ, G.W. 2007. Efflux-Related Resistance to Norfloxacin, Dyes, and Biocides in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(9): 3235-3239.

DIVISION OF HEALTHCARE QUALITY PROMOTION (DHQP). Antimicrobial resistance prevention campaign. [presentación power point]. Atlanta, Georgia, United States of America. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2001. 63 diapositivas.

DUCEL, G.; FABRY, J.; NICOLLE, L. Prevención de las infecciones nosocomiales GUÍA PRÁCTICA. 2ª ed. Organización Mundial de la Salud. 2003. 65 p.

DUQUETTE, R.A.; NUTTALL, T.J. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? *J. Small. Anim. Pract.* 45 (12): 591-597.

FANG, CH-T.; CHEN, H-CH.; CHUANG, Y-P.; CHANG, S-CH.; WANG, Y-T. 2002. Cloning of a Cation Efflux Pump Gene Associated with Chlorhexidine Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(6): 2024-2028.

FOLEY, I.; MARSH, P.; WELLINGTON, E.M.H.; SMITH, A.W.; BROWN, M.R.W. 1999. General stress response master regulator *rpoS* is expressed in human infection: a possible role in chronicity. *J. Antimicrob. Chemother.* 43(1): 164-165.

FRAISE, A.P. 2002. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. *J. Appl. Microbiol.* 92: 158S-162S.

GARCÍA, M.T.; PELAZ, C. Actividad bactericida de 4 productos biocidas frente a *Legionella pneumophila* serogrupo 1. *In*: Congreso Nacional de Sanidad Ambiental (6º, 2001, Madrid. España).

GILBERT, P.; ALLISON, D.G.; MCBAIN, A.J. 2002. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance?. *J. Appl. Microbiol.* 92: 98S-110S.

GOLDSTEIN, C.; LEE, M.D.; SÁNCHEZ, S.; HUDSON, C.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B. 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (3): 723-736.

HE, G-X.; KURODA, T.; MIMA, T.; MORITA, Y.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. 2004. An H⁺-Coupled Multidrug Efflux Pump, PmpM, a Member of the MATE Family of Transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 186(1): 262–265.

HOSEIN, I.K.; HILL, D.W.; JENKINS, L.E.; MAGEE, J.T. 2002. Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. *J. Appl. Microbiol.* 92: 90S-97S.

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

KIM, B-N.; WOO, J-H.; RYU, J.; KIM, Y.S. 2003. Resistance to extended-spectrum cephalosporins and mortality in patients with *Citrobacter freundii* bacteremia. *Infection.* 31(4): 202-207.

L´ABÉE-LUND, T.M.; SORUM, H. 2001. Class 1 integrons mediated antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microb. Drug Resist.* 7: 263-272.

LEE, E-W.; CHEN, J.; HUDA, M.N.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. 2003. Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of *EmeA*, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. *Biol. Pharm. Bull.* 26(2): 266-270.

LEE, E-W.; CHEN, J.; HUDA, M.N.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. 2003. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(12): 3733-3738.

- LEVY, S.B.** 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 92: 65S-71S.
- LI, D-W.; ONISHI, M.; KISHINO, T.; MATSUO, T.; OGAWA, W.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T.** 2008. Properties and expression of a Multidrug efflux pump AcrAB-KocC from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Pharm. Bull.* 31(4): 577-582.
- LOEFFLER, A.; BOAG, A.K.; SUNG, J.; LINDSAY, J.A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K.B.; LLOYD, D.H.** 2005. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 56(4): 692-697.
- LUBELSKI, J.; KONINGS, W.N.; DRIESSEN, A.J.M.** 2007. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(3): 463-476.
- MAILLARD, J-Y.** 2002. Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.* 92: 16S-27S.
- MATSUO, T.; CHEN, J.; MINATO, Y.; OGAWA, W.; MIZUSHIMA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T.** 2008. SmdAB, a heterodimeric ABC-type Multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 190(2): 648-654.
- MCMURRY, L.M.; LEVY, S.B.** 1998. Triclosan blocks lipid synthesis. *Nature.* 394(6): 621-622.
- MCMURRY, L.M.; OETHINGER, M.; LEVY, S.B.** 1998. Overexpression of *marA*, *soxS* or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters.* 166 (2): 305-309.
- MCMURRY, L.M.; MCDERMOTT, P.F.; LEVY, S.B.** 1999. Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(3): 711-713.

MILLER, P.F.; SULAVIK, M.C. 1996. Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21(3): 441-448.

MINATO, Y.; SHAHCHERAGHI, F.; OGAWA, W.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. 2008. Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 31(3): 516-519.

MONTT, J.L. Manual de infecciones intrahospitalarias. Medidas generales de prevención y control. [manual] Santiago, Chile. Hospital Santiago Oriente "Dr. Luis Tisné Brousse". 2004. 101p.

MORITA, Y.; KODAMA, K.; SHIOTA, S.; MINE, T.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. 1998. NorM, a putative multidrug efflux protein of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(7): 1778-1782.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

NARUI, K.; NOGUCHI, N.; WAKASUGI, K.; SASATSU, M. 2002. Cloning and characterization of a novel chromosomal drug efflux gene in *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* 25(12): 1533-1536.

NOGUCHI, N.; SUWA, J.; NARUI, K.; SASATSU, M.; ITO, T.; HIRAMATSU, K.; SONG, J.H. 2005. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *J. Med. Microbiol.* 54: 557-565.

NOLAN, L.K.; WOOLEY, R.E.; BROWN, J.; BLUE, J.L.; CAMP, M. 1987. Comparison of virulence factors and antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* strains from humans and dogs with urinary tract infections. *J. Vet. Int. Med.* 1(4): 152-157.

OGAWA, W.; KOTERASAWA, M.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. 2006. *KmrA* Multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (3): 550-553.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS), DIVISIÓN DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES, PROGRAMA DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES.

1999. Prevención y control de la resistencia a los antimicrobianos en las Américas: Plan estratégico de vigilancia de la resistencia a los antibióticos. 45p.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). 2005. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos -2004-. Brasilia, Brasil. 115p.

O'MAHONY, R.; ABBOTT, Y.; LEONARD, F.C.; MARKEY, B.K.; QUINN, P.J.; POLLOCK, P.J.; FANNING, S.; ROSSNEY, A.S. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Vet. Microbiol.* 109(3-4): 285-296.

PAULSEN, I.; LITTLEJOHN, T.; RÅDSTRÖM, P.; SUNDSTRÖM, L.; SKÖLD, O.; SWEDBERG, G.; SKURRAY, R. 1993. The 3' Conserved Segment of Integrons Contains a Gene Associated with Multidrug Resistance to Antiseptics and Desinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(4): 761-768.

PAULSEN, I.T.; BROWN, M.H.; SKURRAY, R.A. 1998. Characterization of the earliest known *Staphylococcus aureus* plasmid encoding a multidrug efflux system. *J. Bacteriol.* 180(13): 3477-3479.

PELEG, A.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(3): 538-582.

PENNINGTON, T.H. Electrophoretic Typing. in: **SUSSMAN, M.** *Molecular Medical Microbiology.* Barcelona. España. Academic press. 2002. pp. 535-547.

PÉREZ, A.; CANLE, D.; LATASA, C.; POZA, M.; BECEIRO, A.; TOMÁS, M.M.; FERNÁNDEZ, A.; MALLO, S.; PÉREZ, S.; MOLINA, F.; VILLANUEVA, R.; LASA, I.; BOU, G. 2007. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(9): 3247-3253.

- PING, Y.; OGAWA, W.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T.** 2007. Gene cloning and characterization of KdeA, a multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. Biol. Pharm. Bull. 30(10): 1962-1964.
- PINTO, M.E.** 2002. Resistencia antimicrobiana en Chile hoy. Rev. Chil. Infect. 19(3): 213-218.
- POOLE, K.** 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Microbiol. 92: 55S-64S.
- POOLE, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J. Antimicrob Chemother. 56: 20-51.
- PUTMAN, M.; VAN VEEN, H.W.; KONINGS, W.N.** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(4): 672-693.
- QAIYUMI, S.** Macro- and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing. *In*: **SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A.C.** Antimicrobial susceptibility testing protocols. Florida, United States of America. CRC Press. 2007. pp. 75-80.
- ROBERTS, A.P.; DAVIS, I.J.; SEVILLE, L.; VILLEDIEU, A.; MULLANY, P.** 2006. Characterization of the ends and target site of a novel tetracycline resistance-encoding conjugative transposon from *Enterococcus faecium* 664.1H1. J. Bacteriol. 188(12): 4356-4361.
- RUSSELL, A.D.** 2002. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. J. Appl. Microbiol. 92: 121S-135S.
- RUSSEL, A.D.** 2002. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusions. J. Appl. Microbiol. 92: 171S-173S.
- SALYERS, A.A.; SHOEMAKER, N.B.; STEVENS, A.M.; LI, L-Y.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. Microbiol. Rev. 59 (4): 579-590.

SANCHEZ, S.; STEVENSON, M.A.M.; HUDSON, C.R.; MAIER, M.; BUFFINGTON, T. ; DAM, Q. MAURER, J.J. 2002. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs. *J. Clin. Microbiol.* 40 (10): 3586-3595.

SANDERS, W.E.; SANDERS, C.C. 1997. *Enterobacter spp.*: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (2): 220-241.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S; HIRAMATSU, K. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 45(4):1118-1125.

SEGUIN, J.C.; WALKER, R.D.; CARON, J.P.; KLOOS, W.E.; GEORGE, C.G.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *J. Clin. Microbiol.* 37(5): 1459-1463.

SEKIGUCHI, J.; ASAGI, T.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; FUJINO, T.; KOBAYASHI, I.; MORITA, K.; KIKUCHI, Y.; KURATSUJI, T.; KIRIKAE, T. 2005. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain that Caused an Outbreak in Neurosurgery Ward and Its *aac(6')-Iae* Gene Cassette Encoding a Novel Aminoglycoside Acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(9): 3734-3742.

SHAHCHERAGHI, F.; MINATO, Y.; CHEN, J.; MIZUSHIMA, T.; OGAWA, W.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. 2007. Molecular cloning and characterization of a Multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 30(4): 798-800.

SILVER , S.; WENDT, L. 1967. Mechanism of action of phenylethyl alcohol: breakdown of the cellular permeability barrier. *J. Bacteriol.* 93(2): 560-566.

SMITH, R.J. Nucleic Acid Probes and The Polymerase Chain Reaction. *In: SUSSMAN, M.* Molecular Medical Microbiology. Barcelona. España. Academic press. 2002. pp. 549-558.

STICKLER, D.J. 2002. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 92: 163S-170S.

STOKES, H.W.; HALL, R.M. 1989. A novel family of potentially mobile genetics DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3(12): 1669-1683.

STROMMINGER, B.; KEHRENBURG, C.; KETTLITZ, C.; CUNY, C.; VERSPOHL, J.; WITTE, W.; SCHWARZ, S. 2006. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 57(3): 461-465.

SUNDE, M.; NOSTROM, M. 2006. The prevalence of associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 741-747.

TANNER, M.A.C.; EVERETT, C.L.; YOUVAN. 2000. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from canine pet to a human. *J. Clin. Microbiol.* 38(4): 1628-1631.

TEALE, C.J. 2002. Antimicrobial resistance and the food chain. *J. Appl. Microbiol.* 92: 85S-89S.

TSUCHIYA, T.; YAMADA, Y.; SHIOTA, S.; MIZUSHIMA, T.; KURODA, T. 2006. Functional Gene Cloning and Characterization of MdeA, a Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* 29(4): 801-804.

VALI, L.; DAVIES, S.; LAI, L. ; DAVE, J. ; AMYES, S. 2008. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 524-532.

VAN DUIJKEREN, E.; WOLFHAGEN, M.J.H.M.; BOX, A.T.A.; HECK, M.E.O.C.; WANET, W.J.B.; FLUIT, A.C. 2004. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 10(12): 2235-2237.

WANG, M.; SAHM, D.; JACOBY, G.; HOOPER, D. 2004. Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(4): 1295-1299.

WATNICK, P.; KOLTER, R. 2000. Biofilms, City of Microbes. J Bacteriol. 182(10): 2675-2679.

WILKINS, B.M.; FROST, L.S. Mechanisms of gene exchange between bacteria. *In*: **SUSSMAN, M.** Molecular Medical Microbiology. Barcelona. España. Academic press. 2002. pp. 355-400.

WEESE, J.S.; ARCHANBAULT, M.; WILLEY, B.M.; DICK, H.; HEARN, P.; KREISWIRTH, B.N.; SAID-SALIM, B.; MCGEER, A., LIKHOSHVAY, Y.; PRESCOTT, J.F.; LOW, D.E. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. Emerg. Infect. Dis. 11(3): 430-434.

WESTH, H.; ZINN, C.S.; ROSDAHL, V.T.; SARISA STUDY GROUP. 2004. An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. Microb. Drug Resist. 10: 169-176.

WU, K.; AN, F.Y.; CLEWELL, D.B. 1999. *Enterococcus faecalis* pheromone-responding plasmid pAD1 gives rise to an aggregation (clumping) response when cells are exposed to subinhibitory concentrations of chloramphenicol, erythromycin, or tetracycline. Plasmid. 41: 82-88.

XU, X-J.; SU, X-Z; MORITA, Y.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. 2003. Molecular cloning and characterization of the HmrM multidrug efflux pump from *Haemophilus influenzae* Rd. Microbiol. Immunol. 47(12): 937-943.

YAMADA, Y.; HIDEKA, K-I.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. 2006. Gene cloning and characterization of SdrM, a chromosomally-encoded multidrug efflux pump, from *Staphylococcus aureus*. Biol. Pharm. Bull. 29(3): 554-556.

YAMAMOTO, T.; TAMURA, Y.; YOKOTA, T. 1988. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 32(6): 932-935.

ANEXO 1.

PROTOCOLO DE PCR SEGÚN PARTIDORES UTILIZADOS:

Gen <i>smr</i> (Bjorland <i>et al.</i>, 2001)	Gen <i>qacA/qacB</i> (Noguchi <i>et al.</i>, 2005)	
Smr1: 5'- ATA AGT ACT GAA GTT ATT GGA AGT- 3' (24 bases).	QacA/B1: 5'- GCA GAA AGT GCA GAG TTC G- 3' (19 bases).	
Smr2: 5'- TTC CGA AAA TGT TTA ACG AAA CTA- 3' (24 bases).	QacA/B2: 5'- CCA GTC CAA TCA TGC CTG- 3' (18 bases).	
95° C por 60 segundos	Denaturación inicial	96° C por 3 minutos
30 ciclos	Ciclos	25 ciclos
95° C por 60 segundos	Denaturación	94° C por 20 segundos
48° C por 45 segundos	Alineamiento	53° C por 20 segundos
72° C por 60 segundos	Elongación	72° C por 20 segundos
72° C por 60 segundos	Elongación final	72° C por 5 minutos
285 pb	Tamaño de banda esperado	361 pb

ANEXO 2.

COMPOSICIÓN DEL PCR MASTER MIX 2X (FERMENTAS®):

1. 0.05 U/μl ADN *Taq* Polimerasa (recombinante).
2. Buffer de reacción.
3. 4 mM de MgCl₂.
4. 0.4 mM de cada dexosinucleótido tri-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Se utilizaron 12.5 μL de esta mezcla por reacción.

ANEXO 3.

Alineamiento de múltiples secuencias correspondiente a los genes *qacE* y *qacEΔ1* de distintas especies bacterianas nosocomiales disponibles en GenBank, utilizando el algoritmo FAST. La secuencia de consenso (negrita) muestra las secuencias de unión a partidores destacadas en verde (para el partidor con sentido) y rojo (para el partidor sin sentido).

		1		50
qacE E. aerogenes	(1)	-GAGAAATATCATGAAAGGCTGGCTTTTTCTGTTATCGCAATAGTTGG		
qacEdelta1 E.coli pMUR050	(1)	-----ATGAAAGGCTGGCTTTTTCTGTTATCGCAATAGTTGG		
qacEdelta1 K.pneumoniae MGH	(1)	-----ATGAAAGGCTGGCTTTTTCTGTTATCGCAATAGTTGG		
qacEdelta1 P.aeruginosa 142	(1)	-----ATGAAAGGCTGGCTTTTTCTGTTATCGCAATAGTTGG		
qacEdelta1 C.freundii	(1)	-GAGAAATATCATGAAAGGCTGGCTTTTTCTGTTATCGCAATAGTTGG		
qacEdelta1 E.coli	(1)	GGAGAAATATCATGAAAGGCTGGCTTTTTCTGTTATCGCAATAGTTGG		
qacEdelta1 K.pneumoniae	(1)	-----ATGAAAGGCTGGCTTTTTCTGTTATCGCAATAGTTGG		
Consensus	(1)	G T A ATGAAAGGCTGGCTTTTTCTGTTATCGCAATAGTTGG		
		51		100
qacE E. aerogenes	(50)	CGAAGTAATCGCAACATCCGCA-TTAAATCT-----A-GCAGGGCT		
qacEdelta1 E.coli pMUR050	(39)	CGAAGTAATCGCAACATCCGCA-TTAAATCT-----A-GCAGGGCT		
qacEdelta1 K.pneumoniae MGH	(39)	CGAAGTAATCGCAACATCCGCA-TTAAATCT-----A-GCAGGGCT		
qacEdelta1 P.aeruginosa 142	(39)	CGAAGTAATCGCAACATCCGCA-TTAAATCT-----A-GCAGGGCT		
qacEdelta1 C.freundii	(50)	CGAAGTAATCGCAACATCCGCA-TTAAATCT-----A-GCAGGGCT		
qacEdelta1 E.coli	(51)	CGAAGTAATCGCAACATCCGCA-TTAAATCT-----A-GCAGGGCT		
qacEdelta1 K.pneumoniae	(1)	-----CGAGGGCT		
Consensus	(51)	CGAAGTAATCGCAACATCCGCA TTAAATCT A GCAGGGCT		
		101		150
qacE E. aerogenes	(91)	TTACTAAGCTTGCCCTTCCG-CCGTTGTCATAATCGGTATGGCATCGC		
qacEdelta1 E.coli pMUR050	(80)	TTACTAAGCTTGCCCTTCCG-CCGTTGTCATAATCGGTATGGCATCGC		
qacEdelta1 K.pneumoniae MGH	(80)	TTACTAAGCTTGCCCTTCCG-CCGTTGTCATAATCGGTATGGCATCGC		
qacEdelta1 P.aeruginosa 142	(80)	TTACTAAGCTTGCCCTTCCG-CCGTTGTCATAATCGGTATGGCATCGC		
qacEdelta1 C.freundii	(91)	TTACTAAGCTTGCCCTTCCG-CCGTTGTCATAATCGGTATGGCATCGC		
qacEdelta1 E.coli	(92)	TTACTAAGCTTGCCCTTCCG-CCGTTGTCATAATCGGTATGGCATCGC		
qacEdelta1 K.pneumoniae	(9)	TTACTAAGCTTGCCCTTCCG-CCGTTGTCATAATCGGTATGGCATCGC		
Consensus	(101)	TTACTAAGCTTGCCCTTCCG CCGTTGTCATAATCGGTATGGCATCGC		
		151		200
qacE E. aerogenes	(140)	ATTTTATTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGGCTT		
qacEdelta1 E.coli pMUR050	(129)	ATTTTATTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGGCTT		
qacEdelta1 K.pneumoniae MGH	(129)	ATTTTATTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGGCTT		
qacEdelta1 P.aeruginosa 142	(129)	ATTTTATTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGGCTT		
qacEdelta1 C.freundii	(140)	ATTTTATTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGGCTT		
qacEdelta1 E.coli	(141)	ATTTTATTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGGCTT		
qacEdelta1 K.pneumoniae	(58)	ATTTTATTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGGCTT		
Consensus	(151)	ATTTTATTTCTTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGGCTT		
		201		250
qacE E. aerogenes	(190)	ATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAAATTACAGCCATGCGCTGG		
qacEdelta1 E.coli pMUR050	(179)	ATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAAATTACAGCCATGCGCTGG		
qacEdelta1 K.pneumoniae MGH	(179)	ATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAAATTACAGCCATGCGCTGG		
qacEdelta1 P.aeruginosa 142	(179)	ATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAAATTACAGCCATGCGCTGG		
qacEdelta1 C.freundii	(190)	ATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAAATTACAGCCATGCGCTGG		
qacEdelta1 E.coli	(191)	ATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAAATTACAGCCATGCGCTGG		
qacEdelta1 K.pneumoniae	(108)	ATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAAATTACAGCCATGCGCTGG		
Consensus	(201)	ATGCAGTCTGGTCGGGACTCGGCGTCGTCATAAATTACAGCCATGCGCTGG		
		251		300
qacE E. aerogenes	(240)	TTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCT		
qacEdelta1 E.coli pMUR050	(229)	TTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCT		
qacEdelta1 K.pneumoniae MGH	(229)	TTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCT		
qacEdelta1 P.aeruginosa 142	(229)	TTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCT		
qacEdelta1 C.freundii	(240)	TTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCT		
qacEdelta1 E.coli	(241)	TTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCT		
qacEdelta1 K.pneumoniae	(158)	TTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCT		
Consensus	(251)	TTGCTTCATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAGGTATGGGGCT		

ANEXO 4.

Alineamiento de múltiples secuencias correspondiente a genes *transposasa/integrasa* de transposones conjugativos clase III de distintas especies bacterianas nosocomiales disponibles en GenBank, utilizando el algoritmo FAST. La secuencia de consenso (negrita) muestra las secuencias de unión a partidores destacadas en verde (para el partididor con sentido) y rojo (para el partididor sin sentido).

		151		200
S.agalactiaecTn916Int	(110)	AATTTGTTTACTCGTGGA ACTTTGTGGCTACAGACCGAGTACCAGC-AGG		
S.aureus Tn552Int	(151)	TATAGATGGAAAT-AAGTCATATAAAGAACAGGACTTAAGGACTAATCT		
S.mutans cTn916Int	(110)	AATTTATCTATTTCAT GGAAACTTTGTGGCTACGGACAGAGTCCGGC-AGG		
S.pneumoniae transposase	(110)	AATTTGTTTACTCGTGGA AACTTTGTGGCTACAGACCGAGTACCAGC-AGG		
S.suis cTn916Int98HAH33	(110)	AATTTGTTTACTCGTGGA AACTTTGTGGCTACAGACCGAGTACCAGC-AGG		
S.suiscTn916Int	(110)	AATTTGTTTACTCGTGGA AACTTTGTGGCTACAGACCGAGTACCAGC-AGG		
Consensus	(151)	AATTTGTTTACTCGTGGA AACTTTGTGGCTACAGACCGAGTACCAGC AGG		
		201		250
S.agalactiaecTn916Int	(159)	AAAGCGTGATTTG----TATCTCACTTAGAGAGAAAATCGCAGAGTTACAG		
S.aureus Tn552Int	(200)	ATGCGACAAAGCTGATAAAGGACACGTAAATGAACCAAGATAATT		
S.mutans cTn916Int	(159)	TAAACGGGATTTG----TATTCGCACTGCCTGAAAAATCGCAGAAATACAA		
S.pneumoniae transposase	(159)	AAAGCGTGATTTG----TATCTCACTTAGAGAGAAAATCGCAGAGTTACAG		
S.suis cTn916Int98HAH33	(159)	AAAGCGTGATTTG----TATCTCACTTAGAGAGAAAATCGCAGAGTTACAG		
S.suiscTn916Int	(159)	AAAGCGTGATTTG----TATCTCACTTAGAGAGAAAATCGCAGAGTTACAG		
Consensus	(201)	AAAGCGTGATTTG TATCTCACTTAGAGAGAAAATCGCAGAGTTACAG		
		251		300
S.agalactiaecTn916Int	(205)	AAA GACATTCAT --GATGG-----TATTGATGTTGTAGGAAAGA---		
S.aureus Tn552Int	(250)	GATGAATTTGAAACGCCITTCGCTTATGAAATAAAGAAAAGTATAGCCAC		
S.mutans cTn916Int	(205)	AAA GATGTTCAA --GATGG-----GATTGATGTTATCGGCCAAGA---		
S.pneumoniae transposase	(205)	AAA GACATTCAT --GATGG-----TATTGATGTTGTAGGAAAGA---		
S.suis cTn916Int98HAH33	(205)	AAA GACATTCAT --GATGG-----TATTGATGTTGTAGGAAAGA---		
S.suiscTn916Int	(205)	AAA GACATTCAT --GATGG-----TATTGATGTTGTAGGAAAGA---		
Consensus	(251)	AAAGACATTCAT GATGG TATTGATGTTGTAGGAAAGA		
		301		350
S.agalactiaecTn916Int	(242)	AAA TGACA -CTCTGCCAGCTT-TACGCAAAACAGAA CGCTCAAAGACCAA		
S.aureus Tn552Int	(300)	AA TTCAT GGAAAA CCA CTAAT TAC TGTAAA GA AA TAA TTT GATAT C		
S.mutans cTn916Int	(242)	AG ATGACG -CTTTGCCAGCTT-TACGCTAA ACA AA TGC CGTGC CTCCCA		
S.pneumoniae transposase	(242)	AAA TGACA -CTCTGCCAGCTT-TACGCAAAACAGAA CGCTCAAAGACCAA		
S.suis cTn916Int98HAH33	(242)	AAA TGACA -CTCTGCCAGCTT-TACGCAAAACAGAA CGCTCAAAGACCAA		
S.suiscTn916Int	(242)	AAA TGACA -CTCTGCCAGCTT-TACGCAAAACAGAA CGCTCAAAGACCAA		
Consensus	(301)	AAATGACA CTCTGCCAGCTT TACGCAAAACAGAACGCTCAAAGACCAA		
		351		400
S.agalactiaecTn916Int	(290)	-AGGT TAGAAAAA CACTGAAACTGGACGCAA-ATATCTTATGGATATTT		
S.aureus Tn552Int	(350)	CAAGTTATA AAACA AATTATAGTGTATTAAAGCGGATGCC-TAAG CTGT		
S.mutans cTn916Int	(290)	-ATGT AAAAGC AA ACACA AGAGCGGACGTAA-ATATCT GATGG AGATTT		
S.pneumoniae transposase	(290)	-AGGT TAGAAAAA CACTGAAACTGGACGCAA-ATATCTTATGGATATTT		
S.suis cTn916Int98HAH33	(290)	-AGGT TAGAAAAA CACTGAAACTGGACGCAA-ATATCTTATGGATATTT		
S.suiscTn916Int	(290)	-AGGT TAGAAAAA CACTGAAACTGGACGCAA-ATATCTTATGGATATTT		
Consensus	(351)	AGGTTAGAAAAA CACTGAAACTGGACGCAA ATATCTTATGGATATTT		
		401		450
S.agalactiaecTn916Int	(338)	TGAAGAAAG ACAAGT TAGCTGTAAGAA GT --TTGACAGTATTAAGCCAT		
S.aureus Tn552Int	(399)	TATTGATTTCTCTCATCAGGGTGA AAAA TA CTA TC AA AT AGT ACGAT		
S.mutans cTn916Int	(338)	TGA AAA CT ATG CTGGCAG CA AGAA GC --TAGACAG CA TT AA ACCA T		
S.pneumoniae transposase	(338)	TGAAGAAAG ACAAGT TAGCTGTAAGAA GT --TTGACAGTATTAAGCCAT		
S.suis cTn916Int98HAH33	(338)	TGAAGAAAG ACAAGT TAGCTGTAAGAA GT --TTGACAGTATTAAGCCAT		
S.suiscTn916Int	(338)	TGAAGAAAG ACAAGT TAGCTGTAAGAA GT --TTGACAGTATTAAGCCAT		
Consensus	(401)	TGAAGAAAGACAAGT TAGCTGTAAGAA GT TTGACAGTATTAAGCCAT		

ANEXO 5.

PROTOCOLO DE USO ESTRATÉGICO DE ANTISÉPTICOS SEGÚN COMPUESTO ACTIVO (Montt, 2004):

PRINCIPIOS BÁSICOS DE APLICACIÓN

1. Todos los antisépticos, inclusive la clorhexidina, se inactivan en presencia de materia orgánica, por lo que se recomienda limpiar con un tensoactivo –jabón-, de forma previa a su aplicación.
2. En el caso de clorhexidina en base no jabonosa, utilizar alcohol etílico o isopropílico al 70% sin yodo, pues los jabones y halógenos la inactivan.

ALCOHOL ETÍLICO 70% (CON O SIN YODO)

1. Debe aplicarse sobre superficies limpias, pues se consume e inactiva rápidamente en contacto con materia orgánica –coagula proteínas las que actúan protegiendo a los microorganismos-.
2. Su acción germicida en contacto con la piel es casi inmediata. En caso de utilizarse sobre las manos del personal, debe emplearse sobre guantes, pues produce sequedad de la piel.
3. Su efecto residual es muy corto, no debe emplearse como antiséptico prequirúrgico.
4. De elección para antisepsia cutánea previa a procedimientos invasivos de corta duración (punciones intramusculares, subcutáneas y vasculares periféricas), pero debe emplearse sobre piel libre de pelos y por un **tiempo mínimo de contacto de 1 minuto**.
5. Para antisepsia frecuente de las manos “entre pacientes” es recomendable un gel antiséptico y emoliente, con una base de alcohol, junto con el uso de guantes desechables.
No debe reemplazar el lavado clínico de las manos previo a procedimientos invasivos.

TINTURA YODADA (1-2%)

1. Solución alcohólica de amplio espectro, de mayor poder residual pues al volatilizarse el alcohol el yodo se fija a la piel, el contacto prolongado produce irritación de la piel y quemaduras.
2. Se recomienda en extracción de sangre para hemocultivos, luego que se ha tomado la muestra debe ser retirado de la piel con alcohol.
3. **No se recomienda como antiséptico prequirúrgico para procedimientos invasivos de larga duración.**

POVIDONA YODADA (8-10%)

1. Solución de yodo y polivinil-pirrolidona -agente que actúa como transportador y solubilizador del yodo, entregándole mayor efecto residual al permitir una liberación gradual del halógeno-.
2. **Tiempo mínimo de contacto de 2 minutos.**
3. **Al ser menos irritante se recomienda para procedimientos invasivos de larga duración y preparación del campo operatorio.**
4. **No debe diluirse**, la polivinil-pirrolidona se utiliza para disminuir su efecto irritante, formar una película protectora sobre la piel y así permitir “desinfecciones” frecuentes –en animales debe ocuparse pura, además de utilizar un collar isabelino para evitar que se laman-. **Al diluirlos las partículas de yodo se liberan de forma masiva produciendo absorción generalizada con riesgo de toxicidad.**
5. No debe utilizarse en peritoneo o quemaduras, contraindicado en el lavado e irrigación de cavidades.

CLORHEXIDINA + BASE DETERGENTE (2-4%) O ALCOHÓLICA (0,5%).

1. Biguanidina de espectro Gram positivo, con regular efecto sobre hongos y nula acción sobre *Mycobacterium spp.* y Gram negativos.
2. Excelente **efecto residual acumulativo**, forma una película sobre la piel.
3. **Tiempo mínimo de acción de 5 minutos.**
4. Posee baja toxicidad, no se absorbe por la piel. Sin embargo, es ototóxica.
5. Se inactiva con jabón natural y halógenos.
6. Con base detergente recomendado para lavado quirúrgico (2-4%) y el lavado clínico (2%) de las manos en áreas críticas –UCI, cuidados intermedios, neonatología-.
7. Se recomienda para el lavado prequirúrgico de piel. **No debe utilizarse con este fin en área perianal o con riesgo cierto de contaminación fecal, debido a que las enterobacterias son intrínsecamente resistentes a esta.**
8. Cuando se sospeche de brote nosocomial de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marscecens* y *Proteus spp.* debe reemplazarse por povidona yodada y potenciarse con alcohol gel en el lavado quirúrgico de manos.

TRICLOSÁN (0,5-1%)

1. Compuesto fenólico con espectro de acción sobre Gram positivos, Gram negativos (excepto *P. aeruginosa* y *M. tuberculosis*)
2. No se recomienda para la preparación de la piel en procedimientos invasivos.

3. Se utiliza en brotes de *S. aureus* y *Enterococcus spp.*, pero en otras circunstancias sólo se recomienda para el lavado clínico de las manos en áreas no críticas (A y B).
4. La capacidad de inducir fenotipos de resistencia, como compuesto traza en el medio ambiente, hace necesario analizar con cuidado su introducción como biocida en la práctica médica.

ANEXO 6.

PROTOCOLO DE USO ESTRATÉGICO DE DESINFECTANTES SEGÚN COMPUESTO ACTIVO (Ducel *et al.*, 2003):

PRINCIPIOS BÁSICOS DE APLICACIÓN

1. Todos los desinfectantes, sin excepción, son inactivados en presencia de materia orgánica.
2. La limpieza de superficies debe ser mediante **arrastre húmedo** con un tensoactivo –detergente- que evite el levantamiento de partículas.
3. No debe utilizarse compuestos generadores de gases tóxicos e irritantes, como ácido paracético, amoníaco o cloro, en zonas donde se encuentren pacientes hospitalizado, pues favorecen infecciones respiratorias al afectar el funcionamiento de su aparato mucociliar.
4. Deben utilizarse traperos, baldes y escobas únicos para las zonas C y D (para pacientes infecciosos y de unidad de cuidados intensivos).
5. El tensoactivo debe ser aplicado, y su acción reforzada por fricción, luego debe ser retirado con papel desechable. Finalmente, se aplica el biocida en la superficie a desinfectar, dejando actuar por el tiempo requerido y en un área ventilada (en el caso de productores de gases).
6. **Los termómetros son instrumental que requiere desinfección semicrítica, por lo que es recomendable antes de utilizar, eliminar la materia orgánica con un tensoactivo, aplicar alcohol 70% -por 2 minutos-, y secar con papel desechable.**
7. **Los fonendoscopios requieren desinfección simple, y es recomendable, limpiarlos con alcohol 70% “entre pacientes” infecciosos o inmunocomprometidos.**
8. Los platos y bebederos deben ser de metal para poder ser esterilizados (para pacientes UCI, infecciosos, inmunocomprometidos, etc.)
9. Por ningún motivo deben puncionarse las botellas de suero estéril, para extraerlo, debe utilizarse la vía diseñada para ello, aplicando previamente alcohol 70%.
10. Papeles utilizados en limpieza y desinfección deben transportados en bolsas plásticas a contenedores herméticos, evitando su almacenamiento en la sala de tratamiento de pacientes.
11. La aspersion permite una mejor penetración del desinfectante y una menor suspensión de partículas.
12. Los detergentes permiten eliminar materia orgánica insoluble en agua. El detergente enzimático utiliza enzimas proteolíticas que permiten retirar materia orgánica. **No son desinfectantes.**

COMPUESTOS DERIVADOS DE AMONIO CUATERNARIO (QAC/DAC)

1. Compuestos catiónicos de buen espectro de acción a concentraciones recomendadas de trabajo, sin embargo deben utilizarse por un **tiempo mínimo de contacto de 15 minutos, tiempo recomendado 30 minutos.**
2. Existe preparaciones comerciales que incluyen un tensoactivo, siendo muy recomendable utilizarlos puros frente a la exposición a fluidos orgánicos contaminados, junto a preparaciones desinfectantes que utilizan NaOH 2%–hidróxido de sodio-, que aumenta su efectividad.
3. Excelente para superficies metálicas y no porosas, existen productos adicionados con metasilicato -sal sódica del ácido silícico- que aumenta su efectividad.
4. Deben utilizarse a concentraciones recomendadas por el fabricante, para desinfectar pabellón debe utilizarse con una frecuencia mínima de 3 días, y como óptima “entre pacientes”.

HIPOCLORITO DE SODIO (5% (50 g/L) o al 2% como gel)

1. Halógeno altamente corrosivo y tóxico, oxidante de metales y generador de gases.
2. Amplio espectro de acción, utilizado para desinfecciones de alto nivel de instalaciones (pisos, murallas, techos, etc.) por un **tiempo mínimo de 30 minutos.**
3. Para desinfección de alto nivel de instrumental no metálico debe utilizarse a 5000 ppm (1 ppm = 1 mg/L, de esta forma se necesitan 5 gramos, es decir, 100 mL de cloro al 5% y 250 mL de cloro al 2% por litro de solución).
4. Para desinfección de alto nivel de pisos y murallas se debe utilizar a una concentración de 1000 ppm (20 mL de cloro al 5% y 50 mL de cloro al 2% por litro de solución) en salas sin pacientes y ventiladas (frente a exposiciones a agentes infectocontagiosos, o de rutina una vez por semana).
5. Para eliminar parvovirus del medio ambiente se recomiendan concentraciones de cloro de 30 mL de hipoclorito de sodio al 5% en 970 mL de agua (1500 ppm).

GLUTARALDEHÍDO 2%

1. Menos corrosivo sobre metales, pero altamente tóxico, describiéndose propiedades carcinogénicas y teratogénicas, siendo absorbido por piel y mucosas.
2. Se utiliza en desinfección de alto nivel de endoscopios, traqueotubos, y mangueras de ventiladores y maquinas de anestesia. **Tiempo mínimo de acción 45 minutos.**

ÁCIDO PERACÉTICO 3-5%

1. Excelente espectro de acción, **Elimina biofilms.**
2. Ácido fuerte, no genera gases nocivos, pero debe utilizarse en habitaciones ventiladas, con mascarillas, guantes y antiparras. Altamente corrosivo en concentraciones superiores al 10%, no aplicar en habitaciones con pacientes.
3. Excelente para desinfectar pabellón, con **tiempo mínimo de acción de 15 minutos.**

HIDROXIDO DE SODIO (NaOH) 2%

1. Alcali fuerte, con poder desinfectante de amplio espectro, recomendado en caso de exposición a fluidos contaminados, previo a limpieza, **con tiempo mínimo de acción de 15 minutos.**
2. Altamente corrosivo e irritante, usuario debe utilizar guantes de goma gruesos y mascarilla. Debe utilizarse en una habitación ventilada, reduciendo al máximo la exposición de los pacientes.
3. Puede utilizarse junto con desinfectantes comerciales que utilizan como compuesto activo derivados de amonio cuaternario para aumentar su efectividad.