



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



DETECCIÓN DE INTEGRONES EN CEPAS DE *Escherichia coli*
RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS

Rubén Andrés Muñoz Obregón

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA: DRA. BETTY SAN MARTÍN
PROFESORA CONSEJERA: DRA. DANIELA IRAGÜEN
PROFESORA CONSEJERA: DRA. CONSUELO BORIE

SANTIAGO, CHILE
2014



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



DETECCIÓN DE INTEGRONES EN CEPAS DE *Escherichia coli*
RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS

Rubén Andrés Muñoz Obregón

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESORA GUIA: DRA. BETTY SAN MARTÍN

SANTIAGO, CHILE
2014

Agradecimientos

Deseo agradecer a mi profesora guía, la Dra. Betty San Martín Núñez, por el apoyo y las oportunidades brindadas desde que le expresé mi interés por formarme en el área de la farmacología veterinaria y la inocuidad alimentaria. Así también, agradezco a todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria Farmavet, por la ayuda que me han entregado y la buena disposición que siempre han tenido conmigo.

Por supuesto, agradezco también a mi familia, que siempre ha sido el pilar fundamental en mi desarrollo profesional y personal: a mi padre que siempre ha estado presente; a mi mamá, que me apoya y entrega su cariño día a día; a la Gaby, que siempre está preocupada de mí como buena hermana mayor; al Seba, que es uno de mis más grandes motivos de alegría; y a Cristián, que ha sido un apoyo incondicional en los últimos años. Tampoco puedo dejar de agradecer a mis amigas incondicionales Romina Gálvez y Marcela Fresno, que siempre tienen una palabra de aliento cuando es necesario.

A todos y cada uno de ustedes, eternas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Revisión Bibliográfica.....	5
Hipótesis.....	28
Objetivos.....	28
Material y Métodos.....	29
Resultados.....	33
Discusión.....	36
Conclusiones.....	38
Bibliografía.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	31
Partidores utilizados para la detección de los genes <i>Int1</i> e <i>Int2</i> en cepas de <i>E. coli</i> resistentes	
Tabla 2.....	31
Etapas para la amplificación del ADN templado de los genes <i>Int1</i> e <i>Int2</i>	
Tabla 3.....	35
Tabla de contingencia de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de gallinas de postura, distribuidas según tipo de resistencia y presencia de integrones	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	15
Ilustración sobre los tres mecanismos descritos de transmisión horizontal de genes de resistencia a antimicrobianos (RA ^G)	
Figura 2.....	19
Representación esquemática de la estructura básica de un integrón clase 1 y del proceso de adquisición de casetes génicos de resistencia	
Figura 3.....	30
Esquema que representa el proceso realizado para la obtención del ADN amplificado de cepas de <i>E. coli</i> resistentes, aisladas de la microbiota intestinal de gallinas tratadas previamente con antimicrobianos, para identificar la presencia de genes que codifican integrones	

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.....	33
Geles de agarosa que evidencian la presencia de los integrones clase 1 descritos, en cepas de <i>E. coli</i> provenientes de gallinas de postura	
Imagen 2.....	33
Geles de agarosa que evidencian la presencia de los integrones clase 1 descritos, en cepas de <i>E. coli</i> provenientes de gallinas de postura	
Imagen 3.....	34
Gel de agarosa que evidencia la presencia del integrón clase 2 descrito, en una cepa de <i>E. coli</i> proveniente de una gallina de postura	

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es actualmente una problemática de salud pública, debido a que compromete la efectividad de los tratamientos realizados tanto en medicina humana como veterinaria. Este fenómeno tuvo un rápido surgimiento, casi tan pronto como la aparición de los primeros antimicrobianos y se ha diseminado globalmente debido a los mecanismos de transmisión de los determinantes genéticos de resistencia, que facilitan su propagación entre bacterias pertenecientes incluso a distintos géneros.

En las últimas décadas, una de las mayores preocupaciones al respecto ha sido la utilización masiva de antimicrobianos en animales productores de alimentos para consumo humano, debido a que esta situación ejerce una presión de selección de microorganismos resistentes y acelera los procesos de mutación genética, así como la transmisión de genes de resistencia hacia la población humana. Este último proceso está favorecido en gran parte por elementos genéticos móviles, entre los que destacan los integrones, estructuras capaces de adquirir casetes génicos y transferirlos en bloque de una bacteria a otra. Dentro de ellos, las clases 1 y 2 son las que se han encontrado con mayor frecuencia en investigaciones realizadas en el ámbito de la producción animal.

En este estudio se detectó la presencia de integrones clase 1 y clase 2 en cepas de *Escherichia coli* aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura tratadas previamente con antimicrobianos. La identificación de los integrones se hizo mediante la técnica de PCR convencional y dio como resultado la presencia de tres integrones, los que a su vez no presentaron asociación con la multi-resistencia de las cepas analizadas.

Los resultados indican por tanto, que los integrones no se encuentran implicados en la transmisión de resistencia antimicrobiana en las bacterias estudiadas. Esta información difiere de la presentada en estudios similares, donde si bien la prevalencia de integrones clase 2 es variable, la clase 1 tiende a estar presente con prevalencias superiores al 40% y asociados a la transmisión de multi-resistencia, en ambos casos.

ABSTRACT

Nowadays, antimicrobial resistance is a public health problem, because it compromises the effectiveness of the treatments carried out in human medicine, as well as in the veterinary field. This phenomenon had a quick appearance, almost as soon as the discovery of the first antimicrobials occurred, and it has spread around the world due to the transmission mechanisms of the genetic resistance determinants, which facilitate dissemination, even among different genus bacteria.

In the last decades, one of the main concerns in that regard has been the massive use of antimicrobials in human consumption food producing animals, given that this situation exerts a selection pressure on resistant microorganisms and it accelerates genetic mutation processes, as well as the resistance genes transmission to human population. This last process is greatly favoured by mobile genetic elements. Among them integrons stand, which are structures capable of acquiring gen cassettes and transfer them in blocks among different bacteria. Within the integrons, classes 1 and 2 are the most frequently found in studies carried out in livestock animals.

The aim of this study was to look for the presence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from intestinal microbiota of hens previously treated with antimicrobials. The identification of the integrons was carried out through conventional PCR technique and the results were three integrons. Finally, found integrons were not associated with multi-resistance of the strains.

Therefore, the results indicate that integrons are not implicated in the transmission of antimicrobial resistance in the studied bacteria. This information differs from other publications, in which even though the prevalence of class 2 integrons is variable, class 1 integrons tend to have a higher prevalence than the 40% and associated to multi-resistance transmission for both classes.

INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos son utilizados con gran éxito en el tratamiento de las infecciones bacterianas en medicina humana y veterinaria, lo que en la práctica clínica ha facilitado la erradicación y el control de numerosas enfermedades que afectan tanto a animales como al ser humano. Sin embargo, las bacterias son capaces de desarrollar rápidamente estrategias de resistencia que les permiten evadir la acción antimicrobiana.

En las últimas décadas, el uso masivo de antimicrobianos en el ser humano y animales ha causado un problema creciente en cuanto a la resistencia, que involucra cada día un mayor número de cepas, nuevas especies y nuevos mecanismos. Esto genera fallas a los tratamientos antimicrobianos, aumento de la morbilidad y mortalidad, e incremento de los costos de soporte médico, ya sea en humanos, mascotas o animales productivos. La resistencia antimicrobiana en bacterias zoonóticas es de especial preocupación, pues estas bacterias resistentes pueden ser transferidas desde los animales o sus productos a los humanos.

Aunque la resistencia bacteriana clásicamente fue atribuida a mutaciones cromosómicas, actualmente también es asociada a la adquisición de elementos genéticos móviles desde otras bacterias. Éstos incluyen diferentes tipos de segmentos de DNA móvil, tales como plasmidios y transposones, los que pueden a su vez albergar integrones en su interior.

Los integrones son plataformas genéticas que llevan en su interior genes de resistencia y al estar acoplados a plasmidios o transposones, pueden transferir de manera horizontal y en un solo paso los genes a otra bacteria de igual o diferente especie, preferentemente gram-negativas. Es por esto que los integrones en los últimos años han sido objeto de variadas investigaciones a nivel mundial, ya que son potenciales elementos de transmisión de multi-resistencia entre bacterias. A nivel de producciones pecuarias, la transferencia de genes de resistencia entre bacterias, incluso de distinto género, es comúnmente favorecida por la presión de selección ejercida mediante el uso y abuso de antimicrobianos, así sea para uso terapéutico o profiláctico.

De acuerdo a lo señalado, este trabajo se centra en la búsqueda de integrones en cepas de *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura que fueron sometidas a terapias antimicrobianas y su asociación con la transmisión de multi-resistencia.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Origen de los antimicrobianos

A lo largo de la historia, las infecciones bacterianas han constituido la principal causa de morbilidad y mortalidad en animales y humanos, sin embargo, alrededor de la primera mitad del siglo 20, el desarrollo de drogas antimicrobianas permitió controlar a los agentes patógenos bacterianos (Tenover, 2006). Los antimicrobianos son probablemente una de las más exitosas formas de quimioterapia en la historia de la medicina, ya que han salvado millones de vidas y aplacado la mayoría de las enfermedades infecciosas que han afectado la historia humana por muchos siglos. Inicialmente, cuando se introdujeron en la práctica clínica en la década de 1940, estos fármacos eran extremadamente eficientes eliminando bacterias patógenas, lo que hizo creer a muchos que las enfermedades infecciosas pasarían a ser un problema del pasado (Aminov, 2009).

Los fármacos son compuestos naturales, semi-sintéticos y sintéticos, y pueden ser aplicados de forma parenteral, oral o tópica (Kemper, 2008). En los pasados 60-70 años la mayoría de los antimicrobianos han sido descubiertos desde productos naturales que matan bacterias, incluyendo patógenos conocidos, primero en placas de cultivo y posteriormente en infecciones animales. Esto incluye penicilinas y cefalosporinas desde el reino Fungi y una gran cantidad de antimicrobianos de diferentes cepas de la bacteria filamentosa *Streptomyces* spp., tales como la estreptomina, eritromicina, tetraciclina y vancomicina. Las modificaciones semisintéticas han producido segundas y terceras generaciones de lactámicos, tales como las cefalosporinas, mientras que la síntesis total ha creado la segunda generación de eritromicinas, claritromicina y azitromicina. A fines de 1999, ya las fluoroquinolonas representaban una clase de antimicrobiano totalmente sintética (Walsh, 2000).

Sin embargo, la euforia por la potencial conquista de las enfermedades infecciosas fue de corta vida, dado que casi tan pronto como las drogas antibacterianas fueron desplegadas, las bacterias respondieron manifestando variadas formas de resistencia (Tenover, 2006). En las últimas dos décadas la oferta de nuevos fármacos en el mercado ha disminuido, dejando importantes intervalos entre el diagnóstico de patógenos resistentes y opciones efectivas de tratamiento. Grandes compañías se han enfocado en la búsqueda de productos más lucrativos, como lo son los que apuntan al tratamiento de enfermedades crónicas y la mejora de los estilos de vida. Sin embargo, antimicrobianos enfocados en bacterias gram-positivas, incluyendo el *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SAMR), han probado ser comercialmente atractivos y han estimulado la inversión en investigación, como lo ha demostrado el éxito comercial del linezolid de Pfizer® y la daptomicina de Cubist®. Este éxito ha influenciado una positiva percepción del potencial comercial de los antimicrobianos de reducido espectro, en un segmento del mercado pequeño, pero clínicamente crítico y fácilmente accesible. Por otro lado, algunas compañías se han enfocado en la mejora de grupos antimicrobianos ya existentes con el objetivo de ser aplicados contra el SAMR. Algunos ejemplos son las nuevas cefalosporinas, ceftobiprole y ceftaroline (Theuretzbacher, 2009).

Mecanismos de acción de los antimicrobianos

Para una acción antimicrobiana selectiva el blanco debe estar ausente en las células mamíferas o, si está presente, debe diferir suficientemente de su contraparte mamífera para permitir una inhibición selectiva del blanco bacteriano. El peptidoglicano que compone las paredes celulares bacterianas provee un excelente ejemplo de un blanco selectivo, puesto que es esencial en el crecimiento y sobrevivencia de la mayoría de las bacterias y tiene una estructura química y composición diferente a cualquier célula eucarionte. Consecuentemente, las enzimas envueltas en su síntesis y ensamblaje proveen excelentes blancos para una inhibición selectiva (Lambert, 2005).

La acción de los antibacterianos puede ser clasificada como bactericida, si causa la muerte de las bacterias, o bacteriostática, si sólo inhibe el crecimiento bacteriano. Los antimicrobianos bactericidas, tales como los beta-lactámicos, glicopéptidos, fluoroquinolonas, polimixinas y la daptomicina, son a menudo preferidos para el tratamiento de enfermedades que ponen en riesgo la vida de los pacientes, sin embargo, hay importantes excepciones. El cloranfenicol, por ejemplo, ha sido usado exitosamente en el tratamiento de la meningitis, a pesar de ser un antimicrobiano bacteriostático. Éste y otros antimicrobianos bacteriostáticos como los macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas, trimetoprim y la lincomicina, también han mostrado eficacia contra complicadas infecciones. Además, la naturaleza bactericida de un antimicrobiano no es una propiedad intrínseca de él, sino que puede estar influenciada por las especies blanco y/o la concentración de la droga (Hancock, 2005).

Las drogas bacteriostáticas predominantemente inhiben la función ribosomal, teniendo como blanco las subunidades ribosomales 30S y 50S (Kohanski *et al.*, 2007). Los macrólidos, lincosamidas, oxazolidinonas y streptogramina B, bloquean la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad ribosomal 50S, mientras que los aminoglicósidos se unen a la subunidad más pequeña, perturbando la decodificación del ARNm (Lambert, 2005).

Los mecanismos de acción de los antimicrobianos son comúnmente atribuidos a interacciones específicas blanco-droga (Kohanski *et al.*, 2007), siendo las principales:

- (1) Interferencia con la síntesis de pared celular: A este grupo pertenecen los beta-lactámicos, tales como las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas, y los glicopéptidos, incluyendo la vancomicina y teicoplanina. Los agentes beta-lactámicos inhiben la síntesis de la pared celular interfiriendo con las enzimas requeridas para la síntesis de la capa de peptidoglicano, mientras que los glicopéptidos se unen a los residuos D-alanino terminales de la

cadena de peptidoglicano naciente, previniendo los pasos de entrecruzamiento requeridos para la síntesis de una pared celular estable e induciendo por consiguiente la lisis y muerte celular (Tenover, 2006; Kohanski *et al.*, 2007).

- (2) Interferencia con la síntesis y/o reparación del DNA: Las fluoroquinolonas ejercen sus efectos inhibiendo la DNA girasa y topoisomerasa IV, enzimas envueltas en la síntesis de DNA bacteriano, lo que causa rupturas letales de la doble hebra del ADN durante su replicación. El metronidazol es otro fármaco que afecta la integridad cromosómica bacteriana (Lambert, 2005).
- (3) Inhibición de una ruta metabólica: Las sulfonamidas y el trimetoprim bloquean las vías para la síntesis del ácido fórmico. La combinación común de estas drogas antibacterianas, de trimetoprim, un análogo del ácido fólico, más sulfametoxazol, inhibe 2 pasos en la vía enzimática para la síntesis de folato bacteriano (Tenover, 2006). Por otro lado, el isoniazid interfiere en la formación de dos enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos micólicos en *M. tuberculosis*, así como también el triclosán y el hexaclorofeno inhiben enzimas del ciclo de la biosíntesis de ácidos grasos (Lambert, 2005).
- (4) Disrupción estructural de la membrana bacteriana: Las polimixinas ejercen sus efectos inhibitorios incrementando la permeabilidad de la membrana bacteriana y causando la fuga de contenidos bacterianos. El lipopéptido cíclico daptomicina inserta su cola lipídica en la membrana celular bacteriana, provocando la depolarización de la membrana y la eventual muerte de la bacteria (Straus y Hancock, 2006; Tenover, 2006). La pirazinamida es otro ejemplo de alteración de la membrana bacteriana, dado que su hidrólisis al interior de la célula la transforma en ácido pirazinoico, lo que sumado a una falla en el sistema de eflujo llevan a una acidificación interna y muerte del organismo (Lambert, 2005). Los péptidos catiónicos, como la colistina, también ejercen su acción mediante la disrupción de la membrana citoplasmática de bacterias gram-positivas (Hancock, 2005).

Origen de la resistencia bacteriana

Las bacterias, la forma más extendida de vida en nuestro planeta, han demostrado una gran flexibilidad adaptativa y pueden ser encontrados en todos los ambientes, desde el hielo perpetuo hasta el agua hirviendo, desde pHs extremos hasta presiones irresistibles. Sus grandes números poblacionales, su asombrosa plasticidad genómica y su capacidad de intercambio de información genética entre muy diferentes especies, los provee de una adaptabilidad sin fin. Considerando esto, no es extraño que hayan desarrollado mecanismos para resistir cualquier arma que los humanos desarrollen contra ellos (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013).

La resistencia a los primeros antimicrobianos, incluyendo la penicilina y la estreptomicina, fue rápidamente reportada luego de su descubrimiento. Estos resultados sugirieron una población paradójica de organismos resistentes pre-existentes, incluso en la ausencia de la presión evolutiva ejercida por las drogas (Wright y Poinar, 2012). La penicilina fue descubierta por Alexander Fleming en 1928, y ya en 1940, años antes de su introducción como agente terapéutico, una penicilinasa bacteriana fue identificada. Una vez que el antimicrobiano fue utilizado ampliamente, cepas resistentes capaces de inactivar el fármaco se hicieron prevalentes, por lo que se emprendieron estudios para modificar químicamente la penicilina y prevenir la escisión por parte de las penicilinasas. En el caso de la estreptomicina, introducida en 1944 para el tratamiento de la tuberculosis, cepas mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a concentraciones terapéuticas del antimicrobiano fueron encontradas en aumento durante el tratamiento de pacientes. Así también, cuando otros antimicrobianos han sido descubiertos e introducidos en la práctica clínica, ha ocurrido un curso similar de eventos (Davies y Davies, 2010).

La inesperada identificación de resistencia antimicrobiana transferible genéticamente a mediados de 1950 en Japón, cambió el escenario completamente introduciendo el concepto genético, indicando que los genes de resistencia

antimicrobiana podrían ser diseminados por conjugación bacteriana a través de una población completa de patógenos bacterianos. Una reciente base de datos registra la existencia de más de 20.000 potenciales genes de resistencia, de alrededor de 400 tipos diferentes, presentes en la mayoría de las secuencias genómicas bacterianas disponibles. Afortunadamente, el número de determinantes de resistencia funcionales existentes en los patógenos es mucho menor (Davies y Davies, 2010). La lucha por ganar la batalla en contra de las infecciones continúa hasta este día, aunque el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos está empezando a disminuir, mientras las bacterias evolucionan con mecanismos de resistencia cada vez más inteligentes (Tenover, 2006).

Las bacterias pueden manifestar resistencia a drogas antibacterianas a través de una variedad de mecanismos. Subpoblaciones de bacterias pueden sobrevivir a dosis letales de antimicrobianos por un mecanismo transiente y no hereditario llamado persistencia (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013). Por otra parte, poblaciones de bacterias normalmente susceptibles pueden llegar a ser resistentes por una presión de selección, a través de mecanismos de mutación o por la adquisición desde otras bacterias de la información genética que codifica resistencia (Tenover, 2006).

Mecanismos de resistencia bacteriana

Los mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos han sido ampliamente estudiados y han involucrado investigaciones sobre la genética y bioquímica de muchas facetas diferentes del funcionamiento celular bacteriano, demostrando una eleva sofisticación y limitando seriamente la utilidad de las terapias antiinfecciosas (González *et al.*, 2004; Davies y Davies, 2010). Las mutaciones cromosómicas, de carácter espontáneo, pueden generar resistencia por:

- (1) Alteración de la proteína blanco a la cual se une el agente antibacteriano modificando o eliminando el sitio de unión. Es el mecanismo más común de

resistencia a macrólidos por parte de bacterias gram-negativas e implica la modificación del sitio blanco en el ribosoma, específicamente la metilación de un residuo de adenina en el dominio V del ARNr23S. La resistencia a fluoroquinolonas es otro ejemplo, que se atribuye a los efectos debidos a la mutación que afecta los sitios blanco (DNA-girasa y topoisomerasa) del medicamento. En el caso de SAMR, la bacteria altera las proteínas que unen penicilina y evita así la acción del antimicrobiano (Cabrera *et al.*, 2007).

Los beta-lactámicos actúan al fijarse covalentemente a proteínas que unen penicilina (PBP) en la membrana citoplasmática, bloqueando de esta forma la función transpeptidasa y carboxipeptidasa de las PBP en los estadios finales de la síntesis del peptidoglicano. Esto hace que las autolisinas endógenas se activen y lleven a la bacteria a la lisis y muerte celular, sin embargo, se ha descrito en bacterias como *S. pneumoniae* y aislados de *Neisseria* que hay cambios en la estructura de las PBP ocasionados por una estructura tipo mosaico en la secuencia del gen de la proteína PBP-2, probablemente debido a un evento de recombinación interespecie entre *Streptococcus* y *Neisseria* comensales (Cabrera *et al.*, 2007). En el caso de los glicopéptidos, la causa más frecuente de resistencia en *E. faecium* y *E. faecalis* es la adquisición de dos *clusters* de genes que codifican enzimas que producen un precursor modificado del peptidoglicano, generando una unión de mucho menor afinidad con el antimicrobiano (Lambert, 2005).

- (2) Regulación positiva de la producción de enzimas que inactivan al agente antimicrobiano. Es el mecanismo de resistencia que utilizan algunas bacterias frente a los beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas). El ejemplo más representativo son las beta-lactamasas, enzimas que inactivan el antimicrobiano al hidrolizar el anillo beta-lactámico de la molécula. Se han identificado a la fecha más de 1.000 beta-lactamasas relacionadas con resistencia a antimicrobianos, predominantemente en bacterias gram-negativas (Cabrera *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Davies y Davies, 2010). La

producción de estas enzimas ha sido encontrada en un 80 a >90% de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* estudiadas, así como también se ha observado hiperproducción de ellas en patógenos animales, tales como los de la familia *Pasteurellaceae* (Li *et al.*, 2007).

Otra clase importante de antimicrobianos que son destruidos por enzimas son los aminoglicósidos. Se sabe que hay tres tipos de modificaciones catalizadas por O-fosfotransferasas, O-adeniltransferasas y N-acetiltransferasas que inactivan estos medicamentos (Cabrera *et al.*, 2007). Otros ejemplos son la metilasa ribosomal de eritromicina en estafilococos y la acetiltransferasa que inactiva al cloranfenicol (Tenover, 2006; Alekshun y Levy, 2007).

- (3) Regulación negativa o alteración de una proteína canal de la membrana externa que la droga requiere para entrar a la célula. Además de una pequeña capa de peptidoglicano en las bacterias gram-negativas, se conoce una estructura de membrana consistente en lipopolisacáridos y lipoproteínas anclados al peptidoglicano, junto con grandes proteínas de membrana externa, llamadas porinas. Estas porinas varían en número y tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. Las mutaciones que resultan por la alteración de la forma y el número de las porinas ya existentes, influyen en la permeabilidad a los antimicrobianos (Cabrera *et al.*, 2007). En el caso de la resistencia intrínseca de bacterias como *P. aeruginosa* y *Enterococcus* spp se relaciona con la poca cantidad de moléculas de porina, mecanismo que contribuye a la resistencia clínica a imipenemas (Alekshun y Levy, 2007; Cabrera *et al.*, 2007).
- (4) Regulación positiva de bombas que expelen la droga desde la célula. El eflujo como mecanismo de resistencia antimicrobiana fue descrito para las tetraciclinas y ahora es un mecanismo comúnmente encontrado. La mayoría de las proteínas de eflujo pertenecen a cinco distintas familias: la de resistencia-nodulación-

división celular, la facilitadora mayor, la estafilocócica/resistencia a multidrogas pequeñas, la casete ATP-ligante, y la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidrogas (Aleksun y Levy, 2007). El análisis del genoma de bacterias gram-positivas y gram-negativas ha confirmado la amplia distribución de estos sistemas, que pueden llegar a disminuir o inclusive suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos (Cabrera *et al.*, 2007).

El diseño de bombas de eflujo está mediado por proteínas de transporte que confieren la resistencia. En el caso de las bacterias gram-negativas es necesario un sistema de eflujo tripartita para expulsar el antimicrobiano hacia el medio externo: una proteína localizada en la membrana citoplasmática, otra en el espacio periplásmico, llamada proteína de fusión de membrana, y una tercera en la membrana externa o factor de membrana externa. Los sistemas de eflujo particularmente de bacterias gram-negativas se asocian con resistencia a múltiples antimicrobianos de importancia clínica, como las fluoroquinolonas (Cabrera *et al.*, 2007). Por otro lado, elevadas expresiones de bombas de eflujo a multidrogas han sido observadas en *E. coli* y *Salmonella* spp. provenientes de animales de abasto (Li *et al.*, 2007).

Transmisión de la resistencia bacteriana

Las cepas bacterianas resistentes por mutaciones cromosomales son seleccionadas por el uso de antimicrobianos, que eliminan a las cepas susceptibles pero permiten la sobrevivencia y crecimiento de las nuevas cepas resistentes. Este tipo de resistencia se puede transferir a la progenie de la cepa, lo que se denomina “transmisión vertical” (Tenover, 2006).

Además de las mutaciones hay otros mecanismos que generan resistencia en las bacterias, tales como: la reorganización intragenómica de secuencias genómicas o reorganización intracromosomal (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013); la amplificación de genes, que ha realizado notablemente la resistencia a sulfonamidas

y trimetoprim (Alekhun y Levy, 2007; Brochet *et al.*, 2008; Davies y Davies, 2010); y la adquisición de nuevo material genético desde otros organismos resistentes, lo que es denominado “transmisión horizontal”, y puede ocurrir entre cepas de la misma especie o entre diferentes especies y géneros bacterianos (Tenover, 2006). De hecho, lo más probable es que la mayoría de las resistencias a antimicrobianos haya sido obtenida a través de la adquisición de genotipos externos, lo que puede incrementar la aptitud de sobrevivencia de ciertas bacterias en ausencia de la presión selectiva de antimicrobianos, permitiendo de esta manera una rápida emergencia y diseminación de la resistencia a escala mundial (Enne *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005; Binnewies *et al.*, 2006).

Es importante también considerar que existe evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, de que la exposición de bacterias a concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos incrementa las tasas de mutación, así como también la diseminación horizontal de genes de resistencia (Gillespie *et al.*, 2005; Knapp *et al.*, 2008; Aminov, 2009).

Los mecanismos de intercambio genético incluyen:

- (1) Conjugación: En el caso de bacterias gram-negativas es la transferencia de material genético contenido en plasmidios, a través de una hebra sexual o pili, que une a dos organismos (Tenover, 2006; Cabrera *et al.*, 2007). Entre bacterias gram-positivas, usualmente el proceso se inicia con la producción de feromonas sexuales que facilitan la agregación de los organismos donantes y receptores, permitiendo el intercambio de ADN (figura 1) (Tenover, 2006).
- (2) Transducción: Es la transferencia de genes de resistencia desde una bacteria a otra, vía un bacteriófago o virus bacteriano (figura 1) (Tenover, 2006). Si bien no hay duda sobre la existencia de este mecanismo, es un evento relativamente raro, visto más comúnmente en *S. aureus* (Tenover, 2006; Davies y Davies, 2010).

(3) Transformación: Es la transferencia de ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma (figura 1) (Cabrera *et al.*, 2007). Éste parece ser el principal mecanismo de tráfico de ADN en estreptococos, meningococos y géneros relacionados (Davies y Davies, 2010).

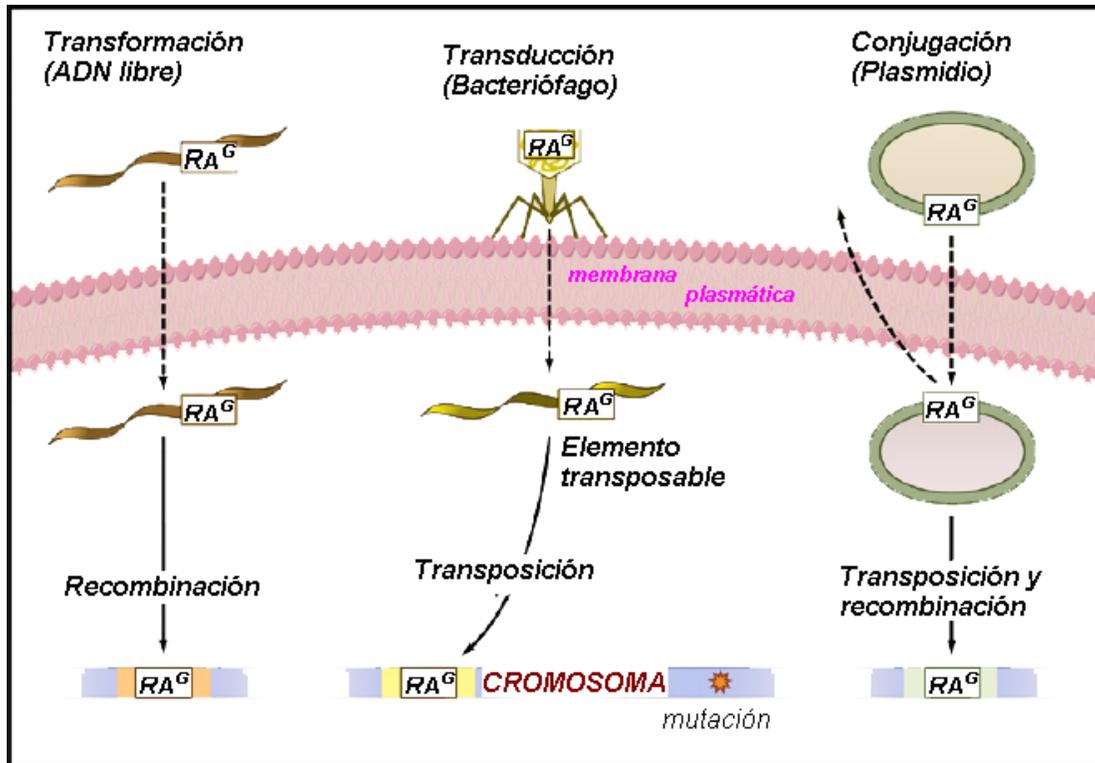


Figura 1. Ilustración sobre los tres mecanismos descritos de transmisión horizontal de genes de resistencia a antimicrobianos (RA^G) (Aleksun y Levy, 2007).

La transferencia e incorporación de genes mediante cualquiera de estos procesos puede ser facilitada por el proceso de transposición, que consiste en el movimiento de una sección de ADN, o transposón (figura 1) (Tenover, 2006). Esta estructura puede contener genes para la resistencia a diferentes antimicrobianos y otras colecciones de genes, o casetes genéticos, unidos para la expresión de un promotor en particular (Aleksun y Levy, 2007; Cabrera *et al.*, 2007).

Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden existir en plasmidios o integrados en otros transposones o cromosoma del hospedero. En general, estas piezas de ADN contienen regiones terminales que participan en la recombinación y especifican una o más proteínas, por ejemplo, una transposasa o recombinasa, que facilita la incorporación en y desde regiones genómicas específicas (Alekshun y Levy, 2007).

Por lejos, la forma más frecuente de transporte de genes es como islas genómicas sobre plasmidios transmisibles, siendo definido un plasmidio como una molécula circular de ADN de doble cadena, capaz de replicarse en forma autónoma (Carattoli, 2009; Norman *et al.*, 2009; Davies y Davies, 2010). Por definición, los plasmidios no portan genes esenciales para el crecimiento de las células hospederas y tienen mecanismos que controlan su número de copias y aseguran una herencia estable durante la división celular (Carattoli, 2009). Dentro de una sola bacteria pueden existir múltiples plasmidios, cuyos genes se suman a la genética total del organismo (Alekshun y Levy, 2007).

Por otro lado, están los integrones, que son elementos de adquisición genética, capaces de integrar y promover la expresión de un gran número de genes en un solo intercambio y han formado parte de la evolución de los genomas bacterianos por cientos de millones de años (Mazel, 2006; Davies y Davies, 2010).

Importancia de los integrones en la resistencia bacteriana

Los integrones son estructuras que poseen una enzima con doble funcionalidad, integrasa y recombinasa, que les permite integrarse en forma estable a otros elementos genéticos, tales como plasmidios y transposones, o bien al cromosoma bacteriano (Alekshun y Levy, 2007). Los componentes esenciales de un integrón incluyen un gen (*intl*) codificando una integrasa sitio-específico (Int), un sitio de recombinación asociado en el que los casetes génicos son insertados (*attI*) y un

promotor (P_c) capaz de dirigir la expresión de genes localizados en los casetes insertados en *attI* (figura 2) (Boucher *et al.*, 2007).

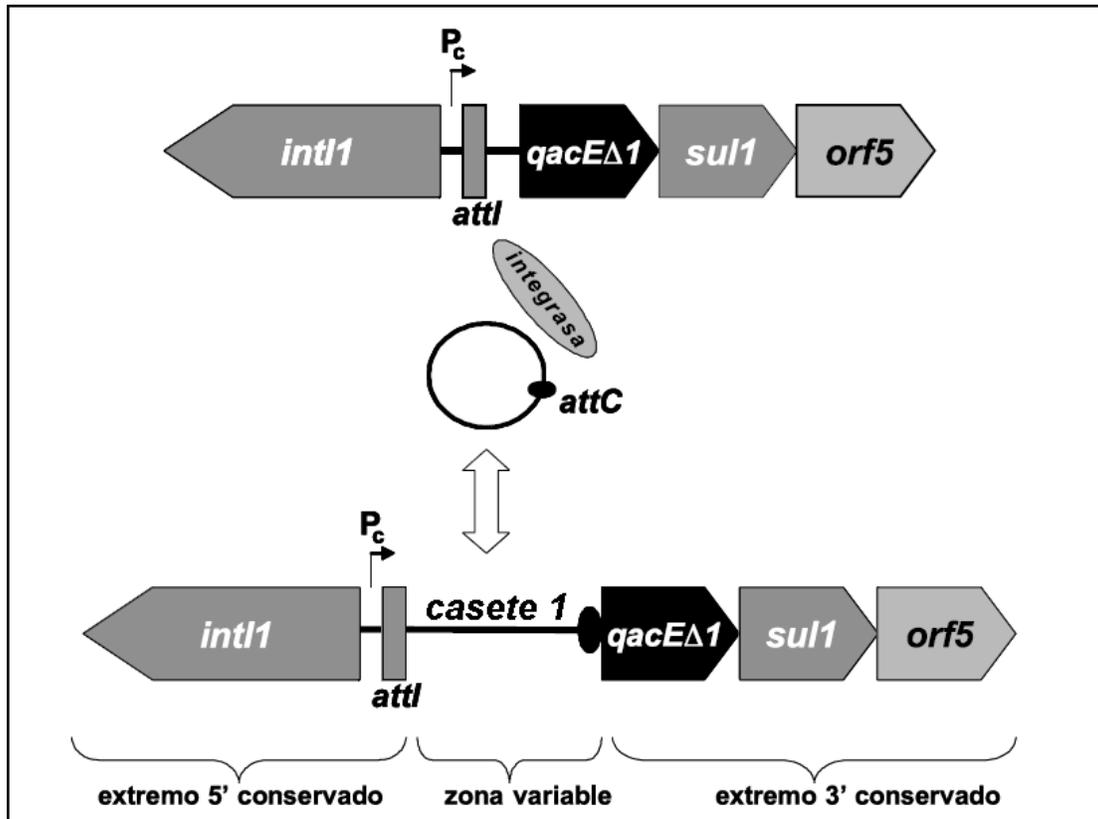


Figura 2. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón clase 1 y del proceso de adquisición de casetes genéticos de resistencia (González *et al.*, 2004).

Los casetes genéticos pueden ser capturados por bacterias que alberguen integrones y de esta manera expresar sus genes (Boucher *et al.*, 2007). Estos casetes normalmente incluyen un solo gen, o marco de lectura abierta completo (orf) y un sitio de reconocimiento de recombinasa sitio-específico conocido como elemento de 59 pb o *attC* (González *et al.*, 2004; Hardwick *et al.*, 2007).

A la fecha se han identificado más de 100 casetes génicos que codifican resistencia a una amplia gama de compuestos antibacterianos, los que incluyen antimicrobianos betalactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y quinolonas (González *et al.*, 2004; Davies y Davies, 2010).

Por otro lado, los integrones se asocian frecuentemente a secuencias de inserción o bien, a transposones y plasmidios conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión inter e intra especie (Mazel, 2006; Alekshun y Levy, 2007).

Se ha establecido que un 10% de los genomas bacterianos parcial o completamente secuenciados, albergan integrones, siendo detectados principalmente en bacilos gram-negativos fermentadores, de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, y en algunos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (González *et al.*, 2004; Boucher *et al.*, 2007). No obstante, también se han encontrado en bacterias gram-positivas, incluyendo corynebacterias, aerococos, brevibacterias y estafilococos (Mazel, 2006).

Actualmente se conocen tres clases de integrones que tienen un rol en la diseminación de genes de resistencia, siendo los integrones clase 1 y clase 2 los más frecuentes en bacterias aisladas desde animales de consumo, aves domésticas y silvestres, y pacientes humanos (Nandi *et al.*, 2004; Mazel, 2006).

La clase 1 representa la estructura más común y se caracteriza por la presencia de un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* que codifican, respectivamente, resistencia a compuestos de amonio cuaternario y a bromuro de etidio, resistencia a sulfonamidas y una proteína con función desconocida (figura 2). Las otras clases de integrones relacionadas con resistencia a antimicrobianos, no poseen extremos 3'CS, ya que sus secuencias

pueden variar por inserción o supresión de algunos genes, o secuencias de inserción (González *et al.*, 2004).

Los integrones clase 2, cuyo gen *intl* posee sólo un 42% de similitud con el de la integrasa clase 1 y no tiene una secuencia 3'CS, poseen una mutación puntual que genera un codón de término hacia el final de la secuencia del gen *intl2*, generando una proteína truncada con limitada eficiencia en su función (Muñoz *et al.*, 2003). Sólo seis casetes de resistencia diferentes han sido encontrados, asociados a esta clase de integrones (Mazel, 2006).

Únicamente un integrón clase 3 ha sido reportado conteniendo el casete génico *bla_{IMP}*, que confiere resistencia a un amplio espectro de betalactámicos incluyendo carbapenemas, y parte del gen *aacA4*, previamente identificado como un casete génico en los integrones clase 1 (Carattoli, 2001). Esta clase de integrones es a menudo considerada 'rara', aun cuando también se ha sugerido que se encuentra más ampliamente distribuida de lo que se piensa (Xu *et al.*, 2007; Barkovskii *et al.*, 2010; Uyaguari *et al.*, 2013).

Se ha descrito una cuarta clase de integrones, denominados superintegrones, que presentan dos características que los distinguen de los integrones conocidos (González *et al.*, 2004; Mazel, 2006). Primero, hay un gran número de casetes génicos que están asociados con esta clase de integrón y hay un alto grado de semejanza (>80%) observado entre los sitios attC de esos casetes. Segundo, el integrón está localizado en el cromosoma y no está asociado con elementos móviles. Además, la mayoría de los casetes génicos de los superintegrones parecen ser exclusivos de cada especie hospedera. Estudios preliminares indican que los casetes génicos de los superintegrones codifican proteínas envueltas en funciones adaptativas, aparte de la resistencia a antimicrobianos. En *Vibrio cholerae*, los genes codifican muchos factores de virulencia, incluyendo el gen toxina termo-estable, el gen hemaglutinina manosa-

fucosa-resistente y un gen lipoproteína, localizados en casetes génicos de superintegrones (Mazel, 2006).

Muchos estudios han identificado integrones clase 1 en aislados obtenidos desde bovinos, cerdos, pollos y peces. Además, esta clase de integrones ha sido descrita en aislados obtenidos de mascotas y animales de zoológicos (Fluit y Schmitz, 2004).

Otros estudios efectuados en diversas bacterias relacionadas con el consumo de productos pecuarios han revelado la presencia de integrones clase 1 en cepas de *E. coli* (enterohemorrágica; O157:H7; serotipos productores de toxina shiga), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, que es pandémica, y en brotes de *V. cholerae*. Menos conocida es la epidemiología de los integrones clase 2, que se han detectado en aislados de *Acinetobacter* spp., *Shigella sonnei* y también en enterobacterias provenientes de infecciones urinarias. Usualmente las clases 1 y 2 de integrones son encontradas por separado y no en un mismo aislado bacteriano (Fluit y Schmitz, 2004).

En Chile, en un estudio publicado el año 2007, se encontró la presencia de integrones en el 25% de cepas de *E. coli* aisladas desde aves y en el 69% de cepas de la misma especie bacteriana aisladas desde cerdos. Así también, 39% de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde cerdos resultaron ser positivas a la presencia de estas estructuras genéticas (Lapierre, 2007).

Uso de antimicrobianos en animales de consumo

Uno de los factores que más ha influido en la diseminación de la resistencia bacteriana ha sido el uso de antimicrobianos en diferentes ámbitos y con diversos objetivos, los que incluyen: promotores del crecimiento, uso profiláctico y terapéutico en animales y humanos, control de plagas, uso como biocidas en artículos de aseo, y cuidado de manos y productos de limpieza doméstica, entre otros. De estos usos,

la utilización terapéutica en humanos da cuenta de menos de la mitad de todas las aplicaciones de antimicrobianos producidos comercialmente (Davies y Davies, 2010). Por el contrario, el mayor porcentaje de antimicrobianos a nivel mundial son utilizados en el escenario agrícola, en animales destinados a consumo humano y en el tratamiento de una variedad de enfermedades en otros animales como abejas, caballos y animales de compañía, entre otros (American Academy of Microbiology, 2009).

En la misma proporción que ha aumentado la productividad en animales de consumo, ha ocurrido un inevitable cambio a sistemas productivos más intensivos en ganado bobino, aves de corral y cerdos. La mayor concentración de animales en estos sistemas, los estresores fisiológicos y ambientales, y los inmaduros sistemas inmunes, hacen que cualquier infección viral o enfermedad bacteriana puedan diseminarse a otros, incluyendo rebaños o parvadas completas. Dependiendo de la naturaleza de la enfermedad el Médico Veterinario pueden intervenir en tales situaciones medicando al grupo entero por medio del alimento o el agua, más que tratando a los animales individualmente. En estos casos se utiliza un tratamiento empírico, es decir, basado en la experiencia del Médico Veterinario, que involucra la consideración de factores como la especie animal y su susceptibilidad al patógeno sospechoso, la virulencia del patógeno, el costo del tratamiento, y los periodos de resguardo aplicables al antimicrobiano (Doyle *et al.*, 2006). Muchos de estos antimicrobianos son miembros de las mismas clases usadas en humanos, haciendo de la resistencia una preocupación por parte de los patógenos transmitidos por los alimentos (American Academy of Microbiology, 2009).

Las contribuciones relativas de los antimicrobianos de amplio y estrecho espectro al problema de la resistencia son difíciles de discriminar. Por un lado, los de estrecho espectro seleccionan especies que siendo naturalmente resistentes no están en el espectro del producto; por el otro lado, los de amplio espectro seleccionan variadas bacterias resistentes presentes en el escenario (American Academy of Microbiology, 2009).

Los organismos comensales que viven en el cuerpo humano así como en los animales pueden ser una fuente de genes de resistencia (American Academy of Microbiology, 2009). Se ha demostrado que la flora intestinal de animales que han sido tratados con agentes antimicrobianos puede servir como reservorio de factores de resistencia. Si las bacterias resistentes a antimicrobianos que son patógenas para los humanos son seleccionadas y el alimento es contaminado durante la faena o la preparación de alimentos, las bacterias pueden causar una infección que requerirá tratamiento y la terapia puede verse comprometida. Además, si bacterias patógenas resistentes a antimicrobianos son seleccionadas en el animal y el alimento es contaminado, las bacterias pueden transferir la resistencia a otras bacterias en el intestino humano (Fedorka-Cray, 2004).

La transferencia de bacterias resistentes a antimicrobianos desde los animales a humanos está bien documentada, dentro de las cuales se puede mencionar la transmisión de *Salmonella* spp. desde vacunos, pollos, cerdos y pavos, y *Campylobacter* spp. desde pollos y pavos (Doyle *et al.*, 2006).

La controversia sobre la contribución del uso de antimicrobianos en animales de consumo a la resistencia bacteriana a fármacos que son clínicamente importantes en medicina humana es fomentada y sostenida por la inhabilidad de obtener información directa y cuantitativa sobre la magnitud y naturaleza de la contribución (Doyle *et al.*, 2006).

El impacto del aumento de la resistencia bacteriana implica fallas en la erradicación bacteriana, fracaso clínico con los tratamientos convencionales, uso indiscriminado de antimicrobianos sofisticados y aumento en los costos de salud para el paciente y para el Estado (Valenzuela *et al.*, 2003).

Monitoreo de la resistencia bacteriana

Las recomendaciones realizadas por Swann en 1969 fueron el primer llamado a prohibir el uso no terapéutico de antimicrobianos en animales y agricultura en general, una sugerencia razonable, pero altamente polémica que ha sido imposible de ejecutar en muchos países hasta el día de hoy (Davies y Davies, 2010). Tras la prohibición en Europa de usar estos fármacos como promotores del crecimiento en animales de producción, se observó una notable disminución en la cantidad de estos fármacos utilizados en veterinaria. Así por ejemplo, en Dinamarca, el uso de antimicrobianos en animales cayó de 206.000 kg en 1994 a 94.000 kg en 2001 (Phillips *et al.*, 2004). Por otro lado, gracias a este tipo de medidas, Holanda y Escandinavia han reducido exitosamente los niveles de resistencia, aunque queda claro que la restricción al uso de antimicrobianos es difícil de implementar a escala global (American Academy of Microbiology, 2009).

La regulación de la venta de agentes antimicrobianos es reconocida como una medida importante para evitar el abuso de ellos (García, 2003). Sin embargo, en muchas naciones en vías de desarrollo, los antimicrobianos carecen relativamente de control y son comparativamente más baratos, costando a menudo 10-30 veces menos que las mismas drogas en países industrializados (Davies y Davies, 2010).

Por otro lado, se ha comprobado que la combinación de una efectiva administración de antimicrobianos con un exhaustivo programa de control de infecciones es una de las principales medidas para disminuir la resistencia y transmisión de genes de resistencia en medicina humana y veterinaria (Dellit *et al.*, 2007).

Con el fin de conocer el nivel de resistencia bacteriana, diferentes países han instaurado Programas de Vigilancia de la resistencia bacteriana. Así por ejemplo, en Estados Unidos, existe un Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia

Antimicrobiana para Bacterias Entéricas (NARMS), establecido en 1996 como un esfuerzo colaborativo entre el Centro de Control de Enfermedades (CDC), la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Este sistema de vigilancia se formó para monitorear los cambios en las susceptibilidades de patógenos zoonóticos mediante aislados obtenidos desde humanos y animales de granja sanos y alimentos crudos de origen animal. También Canadá desarrolló un sistema de vigilancia similar al NARMS de Estados Unidos (Doyle *et al.*, 2006).

El programa de monitoreo desarrollado por Europa es una red internacional compuesta por los sistemas de vigilancia de cada nación, enfocado en los patógenos causantes de infecciones invasivas en humanos y el monitoreo de las variaciones de resistencia antimicrobiana en el tiempo, de lugar en lugar. Dinamarca y Noruega tienen sistemas de vigilancia independientes (Doyle *et al.*, 2006).

En Chile no existe actualmente un programa de monitoreo de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria, así como tampoco existe restricción en la adquisición y uso de estos fármacos, pudiendo adquirirse y emplearse en sistemas productivos, en muchos casos sin la supervisión de un médico veterinario (San Martín, 2005). En una primera instancia, se instauró una Red de Vigilancia de patógenos resistentes sustentada en la información obtenida del laboratorio de referencia del Instituto de Salud Pública (ISP), del proyecto PRONARES del Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que sólo funcionó entre los años 1998 y 2002, y del Programa de Control de Infecciones del Ministerio de Salud (Minsal), enfocado en infecciones intrahospitalarias. El problema de los datos obtenidos en esta instancia es que carecen de representatividad a nivel nacional y además se desconoce si existían controles de calidad efectuados en los laboratorios locales (García, 2003). Esto dejó en evidencia la necesidad de obtener datos en forma más fidedigna y representativa, lo que llevó a la creación de una Red Nacional de Vigilancia de

resistencia que funciona hasta la actualidad, pero únicamente avocada a los brotes humanos intrahospitalarios y de la comunidad (Valenzuela *et al.*, 2003; Chile, 2004).

Resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli*

Numerosos estudios han demostrado la transferencia de genes de resistencia entre bacterias comensales, patógenas y zoonóticas en aves y otros ambientes ecológicos, incluso en ausencia de presión de selección por parte de drogas antimicrobianas (Poppe *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2008; Mathew *et al.*, 2009). Además, cepas comensales de *E. coli* pueden servir como reservorio de genes de resistencia con la habilidad de transferir estos genes a patógenos dentro de los hospederos, así como también dentro del tracto intestinal humano y animal (Blake *et al.*, 2003).

Datos recabados sugieren que nuevos fenotipos de resistencia han emergido de *E. coli* transmitidas por los alimentos, con resistencia a antimicrobianos de primera línea, incluyendo fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación. Las muestras fueron obtenidas específicamente desde aislados recuperados de carnes que se encontraban en el mercado norteamericano (Schroeder *et al.*, 2003).

Otro estudio, efectuado en carne de ave destinada a consumo humano, encontró una alta prevalencia de genes de beta-lactamasas de amplio espectro (BLAE) en cepas de *E. coli*, que a su vez mostraron un alto grado de similitud con aislados humanos (Overdeest *et al.*, 2011).

Los perfiles de resistencia antimicrobiana reportados para *E. coli* O157:H7, bacteria comensal del tracto gastrointestinal bovino, parecen ser bastante consistentes entre diferentes estudios (Wilkerson *et al.*, 2004; Doyle *et al.*, 2006). En uno de ellos se recolectaron aislados bovinos y humanos de esta cepa bacteriana, de los cuales un 7% y un 12% respectivamente fueron resistentes a uno o más antimicrobianos (Wilkerson *et al.*, 2004). Así también, en un estudio efectuado en

cepas de *E. coli* enterohemorrágica se encontró que todas ellas eran sensibles a quinolonas y gentamicina, no así a tetraciclinas (Klein y Bulte, 2003).

Considerando lo que se sabe acerca de la epidemiología de *E. coli*, más la información aportada por diversos estudios, la abundancia de genes de beta-lactamasas de amplio espectro en carne de ave es una explicación probable para los hallazgos actuales en humanos (DuPont, 2007; Johnson *et al.*, 2007). Así también, en un estudio efectuado en carnes de distintas especies animales destinadas a consumo humano, las cepas de *E. coli* presentes en aves resultaron ser más resistentes que las encontradas en carne de bovino y de cerdo (Sheikh *et al.*, 2012).

Los antecedentes expuestos dejan de manifiesto que la resistencia antimicrobiana presentada por bacterias patógenas es una problemática seria y que cada vez adquiere mayor importancia a nivel global, puesto que limita las posibilidades de acción frente a infecciones con microorganismos multi-resistentes. Esta situación revela la necesidad de obtener información actualizada sobre los niveles y tipos de resistencia que afectan a cada nación y nicho ecológico, incluyendo la posibilidad de transmisión horizontal de genes que la codifican, ya que ha demostrado ser clave en este proceso. En este sentido, Chile ha hecho una aproximación a una red nacional de monitoreo, pero ha dejado de lado la ganadería como fuente de determinantes de resistencia, lo que deja un vacío de información al respecto y no permite tener una perspectiva fidedigna de la realidad nacional.

A lo ya mencionado se suma la importancia de las bacterias comensales de animales de consumo, que actúan como reservorio de genes de resistencia y son capaces de transmitirlos en bloque mediante estructuras genéticas móviles. Todas estas circunstancias han llevado a la realización de este estudio, con el objetivo de detectar la presencia de integrones en cepas resistentes de *E. coli* obtenidas desde gallinas de postura.

HIPÓTESIS

La multi-resistencia en cepas de *E. coli* resistentes aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura previamente tratadas con antimicrobianos, se encuentra asociada a la presencia de integrones.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar integrones en cepas de *E. coli* resistentes a diferentes antimicrobianos, aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura previamente tratadas con estos fármacos y determinar si existe asociación con la ocurrencia de multi-resistencia en las cepas bacterianas utilizadas.

Objetivos Específicos

- I) Identificar la presencia de integrones clase 1 y 2 en cepas resistentes de *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura previamente tratadas con antimicrobianos.
- II) Establecer si existe asociación entre la presencia de integrones clase 1 y 2, y la ocurrencia de bacterias multi-resistentes dentro de las cepas analizadas.

MATERIAL y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

Se utilizaron 100 cepas de *E. coli* resistentes, obtenidas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura tratadas previamente con antimicrobianos, como parte de la tesis para optar al Título de Médico Veterinario de Araya (2012). Las cepas se mantuvieron congeladas a -20°C en caldo Trypticase Soya y glicerol al 15%, en el laboratorio de Farmacología Veterinaria, FAVET. Para asegurar la viabilidad de las bacterias se replicó cada cepa en 3 ml de caldo Trypticase Soya y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Luego, a partir de los medios líquidos que presentaron desarrollo bacteriano, se sembró cada cepa en una placa petri con agar MacConkey, utilizando asas estériles y el método del reloj. Las placas con medio sólido fueron incubadas a 37°C durante 24-48 horas.

2. Determinación de la presencia de integrones

La presencia de integrones clase 1 y clase 2 en *E. coli* fue evidenciada mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), según lo descrito por Lapierre (2007).

2.1. Extracción del DNA bacteriano

De cada placa petri sembrada con *E. coli* e incubada a 37°C, se repicó sólo una colonia en 3 ml de caldo Trypticase Soya y se dejó incubando a 37°C durante 18-24 horas. Posteriormente se hicieron diluciones de 50 microlitros (µl) de cada caldo con 150 µl de agua libre de nucleasas en tubos Eppendorf® de 200 µl. Los tubos, previamente rotulados, fueron sometidos a 99°C de temperatura por 10 minutos en el termociclador Labnet®, para lograr la lisis bacteriana y de esta forma obtener el ADN necesario para realizar el PCR (figura 3).

2.2 Amplificación del ADN bacteriano

Para obtener el ADN amplificado se realizó la técnica de PCR convencional, usando como sustrato 3 µl de cada lisado bacteriano, a los que se les agregó 10 µl de

agua libre de nucleasas, 10 μl de Master Mix® (mezcla que contiene buffer, MgCl_2 , Taq polimerasa y dNTPs) y 1 μl de cada partidor en su forma forward y reverse (figura 3). Los partidores que se utilizaron para detectar los genes *Int11* e *Int12*, que codifican la formación de las integrasas de los integrones clase 1 y 2 respectivamente, así como sus temperaturas específicas de hibridación fueron las mismas utilizadas por Araya (2012) y se encuentran detalladas en la tabla 1. Finalmente se obtuvieron 25 μl de solución por cada muestra, los que se procesaron con 30 ciclos en un termociclador Labnet® según lo descrito por la misma autora (tabla 2).

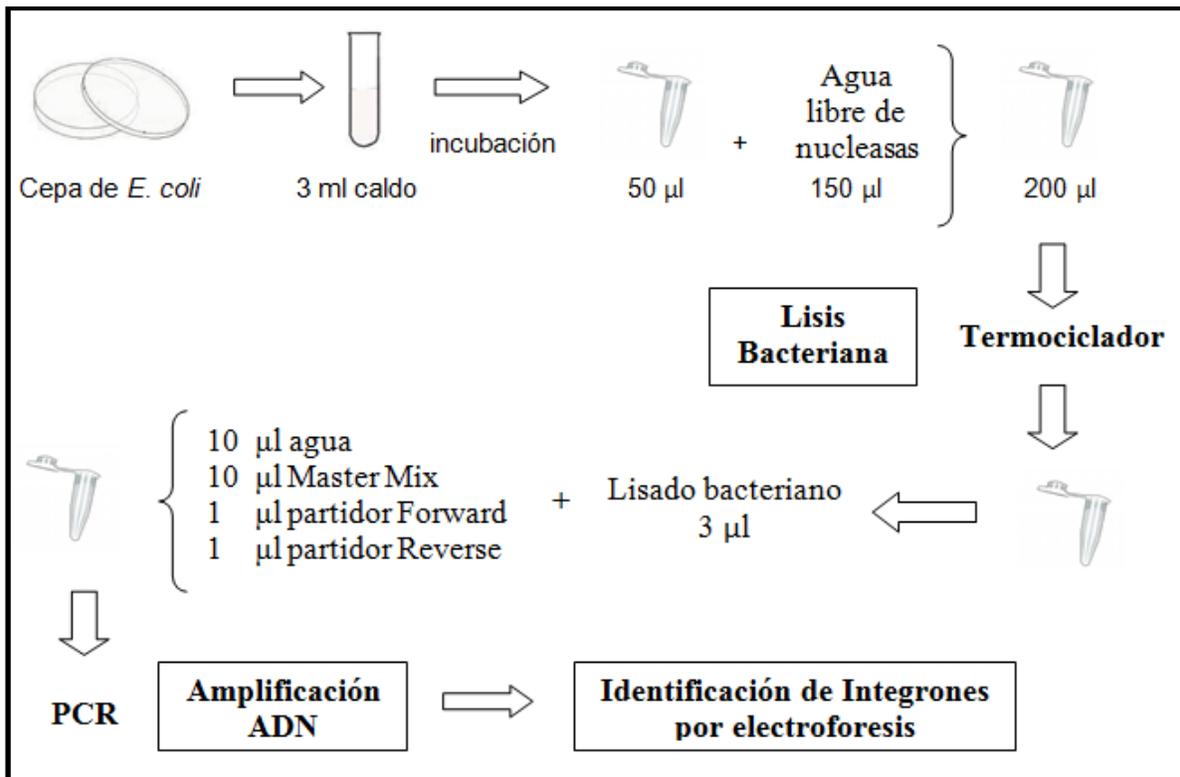


Figura 3. Esquema que representa el proceso realizado para la obtención del ADN amplificado de cepas de *E. coli* resistentes, aisladas de la microbiota intestinal de gallinas tratadas previamente con antimicrobianos, para identificar la presencia de genes que codifican integrones.

Tabla 1. Partidores utilizados para la detección de los genes *Int1* e *Int2* en cepas de *E. coli* resistentes (Araya, 2012).

Gen	Tamaño Región (pb)	Temperatura Hibridación (°C)	Secuencia Nucleotídica (5' a 3')
<i>Int1</i>	280	60	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC
<i>Int2</i>	232	60	TTATTGCTGGGATTAGGC ACGGCTACCCTCTGTTATC

Tabla 2. Etapas para la amplificación del ADN templado de los genes *Int1* e *Int2*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Inicio	95	3
Desnaturación	94	1
Hibridación	60	0,5
Elongación	72	0,5
Elongación Final	72	10
Conservación	4	∞

2.3 Identificación de la presencia de genes *Int1* e *Int2*.

Una vez completada la amplificación del ADN se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa con buffer TAE (tris aminometano, ácido acético y EDTA) 1x. El gel fue elaborado con agarosa 2% en TAE 1x, con 10 µl de GelRed®, que es una tinción de ácidos nucleicos con acción equivalente a la del bromuro de etidio, pero sin la toxicidad de éste. Esta tinción permitió la posterior visualización de las marcas positivas en los gels de agarosa, mediante un transiluminador de luz UV. Una vez puesto el gel y el buffer TAE 1x en la cámara de electroforesis se colocaron los 10 µl de cada amplificado mezclados con 2 µl de buffer de carga (glicerol al 30% en agua, xylecianol FF 0,25%, azul de bromofenol 0,25%) en cada pocillo y se dejó funcionar la cámara por 3 horas y 30 minutos a 80 Volts. En cada procedimiento se usó un marcador de peso molecular de 50 pb (GeneRuler® 50 bp DNA Ladder), un control positivo correspondiente a una cepa de *E. coli* caracterizada previamente en el laboratorio de Farmacología Veterinaria FAVET por Lapierre (2007) y un control negativo en el que se utilizó el ADN de la cepa ATCC 25922 de *E. coli*.

Finalmente los geles de agarosa obtenidos fueron visualizados y analizados mediante un transiluminador UV, que permitió ver las marcas fluorescentes dadas por los productos génicos de diversos pesos moleculares. En esta etapa se usaron antiparras acrílicas como protección ante la radiación UV.

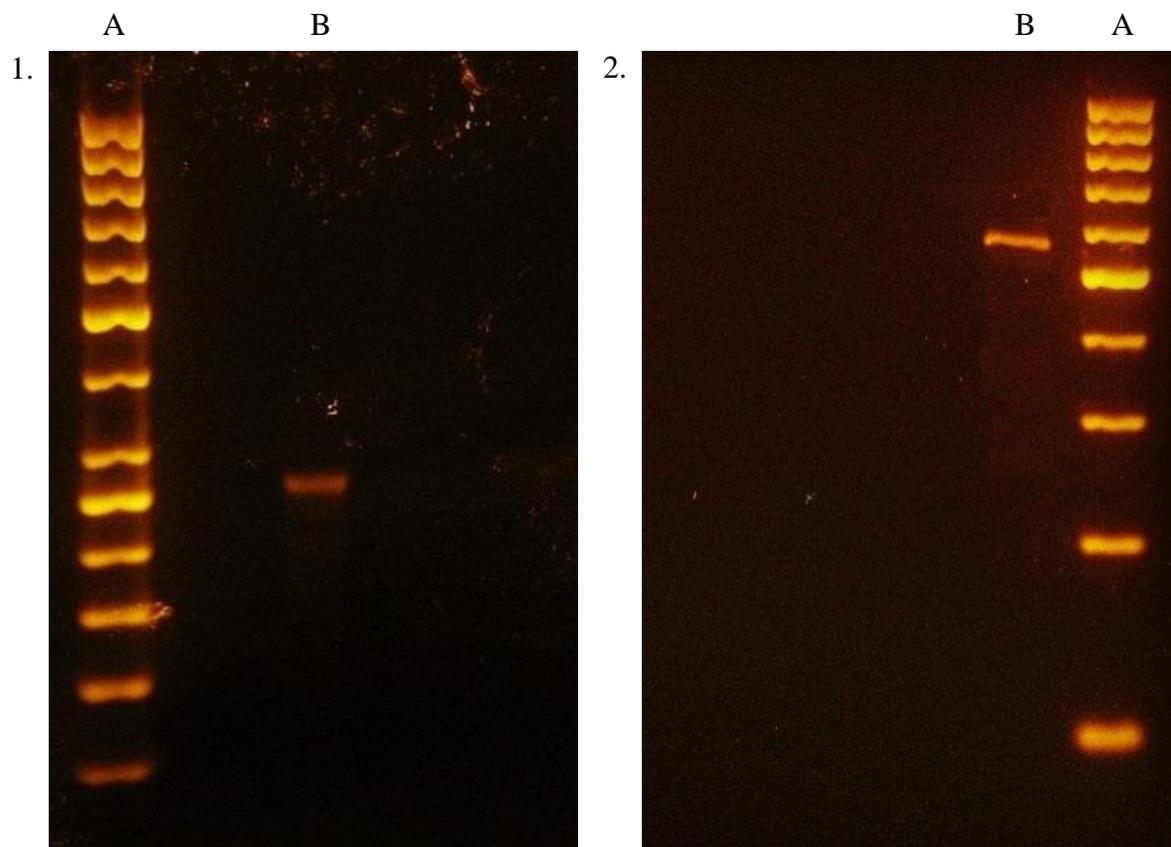
3. Análisis de resultados

En primera instancia se efectuó un análisis porcentual de los resultados obtenidos y posteriormente se realizó la prueba exacta de Fisher para determinar si la multi-resistencia de las cepas se encuentra asociada a la presencia de integrones, utilizando un 95% de confianza.

RESULTADOS

Objetivo 1: Identificar la presencia de integrones clase 1 y 2 en cepas resistentes de *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura.

De las 100 cepas resistentes de *E. coli*, sólo tres presentaron integrones, de los cuales dos correspondían a la clase 1 y uno a la clase 2. En las imágenes 1 y 2 se pueden observar los genes *Int1* encontrados, que tienen un peso molecular de 280 pb, por lo que se encuentran a la altura del segmento que está entre las 250 y 300 pb.



Imágenes 1 y 2. Geles de agarosa que evidencian la presencia de los integrones clase 1 descritos, en cepas de *E. coli* provenientes de gallinas de postura. A: Columnas que corresponden a marcadores de peso molecular de 50 pb. B: Columnas que presentan marca correspondientes a genes *Int1*.

En la imagen 3 se puede observar el gen *Int2* encontrado, que tiene un peso molecular de 232 pb, por lo que se ubica a la altura del segmento que está entre las 200 y 250 pb.

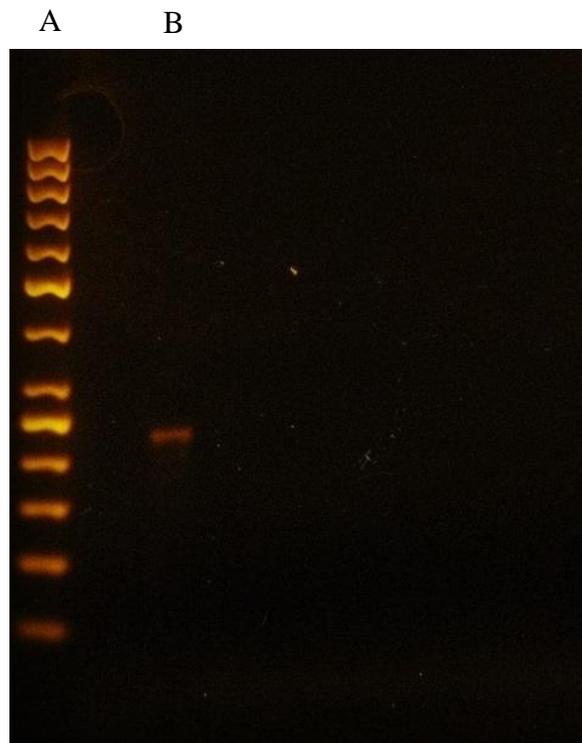


Imagen 3. Gel de agarosa que evidencia la presencia del integrón clase 2 descrito, en una cepa de *E. coli* proveniente de una gallina de postura. A: Columna que corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb. B: Columna que presenta marca correspondiente al gen *Int2*.

Desde una perspectiva epidemiológica, podría decirse que la prevalencia de integrones fue de un 3% en las cepas de *E. coli* resistentes a uno o más antimicrobianos, aisladas de gallinas ponedoras. De este porcentaje, un 2% corresponde a integrones clase 1 y un 1% a la clase 2.

Objetivo 2: Establecer si existe asociación entre la presencia de integrones clase 1 y 2, y la ocurrencia de bacterias multi-resistentes dentro de las cepas analizadas.

Con el fin de establecer si existe asociación entre multi-resistencia y la presencia de integrones en las cepas estudiadas, se utilizó la prueba exacta de Fisher, dado que los datos no cumplen con los supuestos necesarios para realizar un test paramétrico. Con

este objetivo, se clasificaron las cepas como de resistencia múltiple si presentaban resistencia a más de una clase antimicrobiana y de resistencia única, si eran resistentes a sólo una clase. Este criterio de selección fue adoptado según lo descrito por Sostarich *et al.* (2008) y López-Pueyo *et al.* (2011).

De las 100 cepas utilizadas, 70 eran multi-resistentes y las 30 restantes presentaban resistencia única. Con estos datos se estructuró la tabla de contingencia requerida para el análisis estadístico, en la cual se usó la cantidad total de integrones encontrados, indistintamente de su clase, debido a la baja incidencia de estas estructuras en las muestras (tabla 3).

Tabla 3. Tabla de contingencia de las cepas de *E. coli* aisladas de gallinas de postura con terapia previa de antimicrobianos, distribuidas según tipo de resistencia y presencia de integrones.

Integrones	Resistencia		TOTAL
	Múltiple	Única	
Presencia	3	0	3
Ausencia	67	30	97
TOTAL	70	30	100

Las hipótesis a contrastar son las siguientes:

H_0 : No existe asociación entre la ocurrencia de multi-resistencia y la presencia de integrones en las cepas bacterianas analizadas.

H_1 : Existe asociación entre la ocurrencia de multi-resistencia y la presencia de integrones en las cepas bacterianas analizadas.

Para realizar la prueba de hipótesis se utilizó el software Epidat 3.1® donde se ingresaron los datos y se obtuvo un valor-p unilateral de 0,3385 con un 95% de confianza. Dado que este valor es mayor a 0,05 no es posible rechazar H_0 , por lo tanto no se puede afirmar que exista asociación entre la ocurrencia de multi-resistencia y la presencia de integrones en las cepas bacterianas estudiadas, rechazándose la hipótesis planteada en este estudio.

DISCUSIÓN

Del cepario de muestras de *E. coli* se tomaron 100 cepas resistentes a al menos un antimicrobiano y mediante la técnica de PCR convencional se estableció la presencia de integrones clase 1 y clase 2. Tras este procedimiento, se encontraron sólo dos cepas con el gen *Int1* y una única cepa con el gen *Int2*, indicadores de la presencia de integrones de cada clase, respectivamente.

Todas las cepas utilizadas provenían de un estudio previo en el que se les realizó un perfil de resistencia a antimicrobianos y de acuerdo a esta información, las cepas que presentaron integrones en este trabajo resultaron ser multi-resistentes. La importancia de esta información radica en que los integrones les confieren a estas bacterias la habilidad de transferir la multi-resistencia a todos estos fármacos en un solo intercambio si se asocian a un plasmidio o transposón, lo que ha sido corroborado por diversos estudios (Wang *et al.*, 2008; Macedo-Viñas *et al.*, 2009; Liaw *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010; Shaheen *et al.*, 2010; Soufi *et al.*, 2011).

Sin embargo, mediante el test exacto de Fisher se demostró que no existe asociación entre la multi-resistencia de las cepas en estudio y la presencia de integrones, lo que se debe, sin duda, a la baja cantidad de cepas con integrones encontrados en la muestra experimental. Estos resultados difieren del resto de los trabajos que han buscado integrones clase 1 en cepas de *E. coli* provenientes de aves, donde se han obtenido prevalencias que por lo general superan el 40% (Lu, *et al.*, 2010; Soufi *et al.*, 2011; Marchant, *et al.*, 2013). Lo mismo sucede al comparar los resultados con estudios en que se ha examinado la presencia de integrones clase 1 en diferentes especies bacterianas, así como también en diferentes especies de hospederos, incluyendo humanos. Los integrones clase 2 por su parte, presentan incidencias más variables en las distintas publicaciones, encontrándose incluso ausentes en ciertas ocasiones (Muñoz *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004; Moraga *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Shaheen *et al.*, 2010).

La comparación más cercana es la que se puede realizar con el estudio nacional realizado por Lapierre (2007), en el que se encontraron integrones en el 25% de las cepas de *E. coli* obtenidas de aves, versus los porcentajes considerablemente inferiores de

integrones clase 1 y clase 2 encontrados en este trabajo, correspondientes al 2% y 1% respectivamente.

Esto indica que en las cepas de *E. coli* obtenidas desde la microbiota de gallinas ponedoras utilizadas en este estudio, los integrones no son la estructura predominante en la transferencia de multi-resistencia. Incluso es probable que dicha multi-resistencia sea resultado de la sumatoria de la transferencia de casetes génicos o genes individuales entre bacterias, así sea de manera horizontal o vertical.

CONCLUSIONES

1. Existe una baja prevalencia de cepas de *E. coli* de la microbiota intestinal de gallinas con integrones en el grupo estudiado, siendo específicamente un 2% de la clase 1 y un 1% de la clase 2.
2. La ocurrencia de multi-resistencia en las cepas bacterianas analizadas no se encuentra asociada a la presencia de los integrones encontrados.
3. En las cepas estudiadas la transmisión de resistencia bacteriana ocurrió por mecanismos que prescinden de los integrones como estructuras genéticas facilitadoras de este proceso.
4. La baja cantidad de cepas con integrones encontrada en este estudio difiere significativamente de lo expuesto en la literatura. Esto hace que sea poco probable que los valores expuestos representen la realidad de la situación nacional en la población local de gallinas ponedoras.
5. Se recomienda efectuar más estudios para determinar la presencia de integrones en la microbiota de gallinas ponedoras a nivel local, así como también en el resto de los animales destinados a consumo humano. Esta información es necesaria para conocer la relevancia de los integrones en la diseminación de genes de resistencia a en el contexto nacional.

6. BIBLIOGRAFIA

- **ALEKSHUN, M.; LEVY, S.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128:1037-1050.
- **AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY.** 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective of an old problem. Reporte basado en un coloquio realizado en el Fondation Mérieux Conference Center en Annecy, Francia, 12 al 14 de octubre de 2008.
- **AMINOV, R.** 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*. 11:2970-2988.
- **ARAYA, C.** 2012. Caracterización genotípica de la resistencia antimicrobiana en cepas aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura sometidas a tratamiento con antimicrobianos. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 62 p.
- **BARKOVSKII, A.; GREEN, C.; HURLEY, D.** 2010. The occurrence, spatial and temporal distribution, and environmental routes of tetracycline resistance and integrase genes in *Crassostrea virginica* beds. *Marine Pollution Bulletin*. 60 (12):2215-2224.
- **BINNEWIES, T.; MOTRO, Y.; HALLIN, P.; LUND, O.; DUNN, D.; LA, T.; HAMPSON, D.; BELLGARD, M.; WASSENAAR, T.; USSERY, D.** 2006. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Functional & Integrative Genomics*. 6:165-185.
- **BLAKE, D.; HILLMAN, K.; FENLON, D.; LOW, J.** 2003. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 95:428-436.
- **BOUCHER, Y.; LABBATE, M.; KOEING, J.; STOKES, H.** 2007. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in Microbiology*. 15:301-309.

- **BROCHET, M.; COUVÉ, E.; ZOUINE, M.; POYART, C.; GLASER, P.** 2008. A naturally occurring gene amplification leading to sulfonamide and trimethoprim resistance in *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Bacteriology*. 190:672-680.
- **CABRERA, C.; GÓMEZ, R.; ZÚÑIGA, A.** 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*. 38:149-158.
- **CARATTOLI, A.** 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*. 32:243-259.
- **CARATTOLI, A.** 2009. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53:2227-2238.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2004. Decreto Supremo Nº 158 Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. 22 octubre 2004.
- **DAVIES, J.; DAVIES, D.** 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74:417-433.
- **DELLIT, T.; OWENS, C.; MCGOWAN, J.; GERDING, D.; WEINSTEIN, A.; BURKE, J.; HUSKINS, W.; PATERSON, D.; FISHMAN, N.; CARPENTER, C.; BRENNAN, P.; BILLETER, M.; HOOTON, T.** 2007. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clinical Infectious Diseases*. 44:159-177.
- **DOYLE, M.; BUSTA, F.; CORDS, B.; DAVIDSON, P.; HAWKE, J.; HURD, H.; ISAACSON, R.; MATTHEWS, K.; MAURER, J.; MENG, J.; MONTVILLE, T.; SHRYOCK, T.; SOFOS, J.; VIDAVER, A.; VOGEL, L.; CLEVELAND, J.; NEWSOME, R.; SHANK, F.** 2006. Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5:71-137.
- **DUPONT, H.** 2007. The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Food Safety*. 45:1353-1361.

- **ENNE, V.; BENNETT, P.; LIVERMORE, D.; HALL, L.** 2004. Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53:958-963.
- **FEDORKA-CRAY, P.** 2004. Factors affecting the emergence of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. In: 23rd World Buiatrics Congress. Québec, Canada. July 11-16, 2004. pp. 3.
- **FLUIT, A.; SCHMITZ, F.** 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*. 10:272-288.
- **GARCÍA, P.** 2003. Resistencia bacteriana en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 20:11-23.
- **GILLESPIE, S.; BASU, S.; DICKENS, A.; O’SULLIVAN, D.; MCHUGH, D.** 2005. Effect of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56:344-348.
- **GONZÁLEZ, G.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.** 2004. Integrones y *cassettes* genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile*. 132:619-626.
- **HANCOCK, R.** 2005. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *The Lancet Infectious Diseases*. 5:209-218.
- **HARDWICK, S.; STOKES, H.; FINDLAY, S.; TAYLOR, M.; GILLINGS, M.** 2007. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 278:207-212.
- **JOHNSON, J.; SANNES, M.; CROY, C.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M.; BENDER, J.; SMITH, K.; WINOKUR, P.; BELONGIA, E.** 2007. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerging Infectious Diseases*. 13:838-846.
- **KEMPER, N.** 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*. 8:1-13.

- **KLEIN, G.; BULTE, M.** 2003. Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal species. *Food Microbiology*. 20:27-33.
- **KNAPP, C.; ENGEMANN, C.; HANSON, M.; KEEN, P.; HALL, K.; GRAHAM, D.** 2008. Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures. *Environmental Science & Technology*. 42:5348-5353.
- **KOHANSKI, M.; DWYER, D.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C.; COLLINS, J.** 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 130:797-810.
- **LAMBERT, P.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57:1471-1485.
- **LAPIERRE, L.** 2007. Caracterización fenotípica y genotípica de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Salmonella* spp, *E. coli* y *Enterococcus* spp, aisladas de aves y cerdos. Tesis para optar al Grado de Académico de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias.
- **LI, X.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L.** 2007. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*. 121:197-214.
- **LIAW, S.; LEE, Y.; HSUEH, P.** 2010. Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35:126-130.
- **LIU, M.; WU, C.; LIU, Y.; ZHAO, J.; YANG, Y.; SHEN, J.** 2009. Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of *Arcanobacterium pyogenes* in bovine endometritis. *Journal of Dairy Science*. 92 (8):3659-3666.
- **LÓPEZ-PUEYO, M.; BARCENILLA-GAITE, F.; AMAYA-VILLAR, R.; GARNACHO-MONTERO, J.** 2011. Antibiotic multiresistance in critical care units. *Medicina Intensiva*. 35 (1):41-53.

- **LU, L.; DAI, L.; WANG, Y.; WU, C.; CHEN, X.; LI, L.; QI, Y.; XIA, L.; SHEN, J.** 2010. Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China. *Acta Tropica*. 113:20-25.
- **LUO, N.; PEREIRA, S.; SAHIN, O.; LIN, J.; HUANG, S.; MICHEL, L.; ZHANG, Q.** 2005. Enhanced *in vivo* fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:541-546.
- **MACEDO-VIÑAS, M.; CORDEIRO, N.; BADO, I.; HERRERA-LEON, S.; VOLA, M.; ROBINO, L.; GONZALEZ SANZ, R.; MATEOS, S.; SCHELOTTO, F.; ALGORTA, G.; AYALA, J.; ECHEITA, A.; VIGNOLI, R.** 2009. Surveillance of antibiotic resistance evolution and detection of class 1 and 2 integrons in human isolates of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium obtained in Uruguay between 1976 and 2000. *International Journal of Infectious Diseases*. 13:342-348.
- **MARCHANT, M.; VINUÉ, L.; TORRES, C.; MORENO, M.** 2013. Change of integrons over time in *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pigs and chickens. *Veterinary Microbiology*. 163:124-132.
- **MATHEW, A.; LIAMTHONG, S.; LIN, J.; HONG, Y.** 2009. Evidence of class 1 integron transfer between *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. on livestock farms. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6:959-964.
- **MAZEL, D.** 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature*. 4:608-620.
- **MORAGA, R.; SANTANDER, E.; ARIAS, T.; MÉNDEZ, F.** 2007. Integrones y su relación con el fenotipo en bacilos gramnegativos aislados en el Hospital Torres Galdames de Iquique, Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 24 (50):384-390.
- **MUÑOZ, J.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R.; GONZÁLEZ, G.** 2003. Integrones y *cassettes* genéticos de Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Shigella flexneri*. *Revista Médica de Chile*. 131:727-733.

- **NANDI, S.; MAURER, J.; HOFACRE, C.; SUMMERS, A.** 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:7118-7122.
- **NORMAN, A.; HANSEN, L.; SORENSEN, S.** 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364:2275-2289.
- **OVERDEVEST, I.; WILLEMSSEN, I.; RIJSNBURGER, M.; EUSTACE, A.; XU, L.; HAWKEY, P.; HECK, M.; SAVELKOUL, P.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; VAN DEN ZWALUW, K.; HUIJSDENS, X.; KLUYTMANS, J.** 2011. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerging Infectious diseases*. 17:1216-1222.
- **PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J.** 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53:28-52.
- **POPPE, C.; MARTIN, L.; GYLES, C.; REID-SMITH, R.; BOERLIN, P.; MCEWEN, S.; PRESCOTT, J.; FORWARD, K.** 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* susp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:1184-1192.
- **RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J.** 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*. 303:293-297.
- **SAN MARTÍN, B.; BRAVO, V.; BORIE, C.** 2005. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 37:117-123.
- **SCHROEDER, C.; WHITE, D.; GE, B.; ZHANG, Y.; MCDERMOTT, P.; AYERS, S.; ZHAO, S.; MENG, J.** 2003. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *International Journal of Food Microbiology*. 85:197-202.

- **SHAHEEN, B.; OYARZABAL, O.; BOOTHE, D.** 2010. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical *E. coli* isolates from the US. *Veterinary Microbiology*. 144:363-370.
- **SHEIKH, A.; CHECKLEY, S.; AVERY, B.; CHALMERS, G.; BOHAYCHUK, V.; BOERLIN, P.; REID-SMITH, R.; ASLAM, M.** 2012. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meat purchased in Alberta, Canada. *Foodborne Pathogens and Disease*. 9:625-631.
- **SOSTARICH, A.; ZOLLDANN, D.; HAEFNER, H.; LUETTICKEN, R.; SCHULZE-ROEBECKE, R.; LEMMEN, S.** 2008. Impact of multiresistance of Gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. *Infection*. 36 (1):31-35.
- **SOUFI, L.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; ABBASSI, M.; RUIZ, E.; ZARAZAGA, M.; HASSEN, A.; HAMMAMI, S.; TORRES, C.** 2011. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulfonamide resistance genes and integrones. *International Journal of Food Microbiology*. 144:497-502.
- **STRAUS, S.; HANCOCK, R.** 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758:1215-1223.
- **TENOVER, F.** 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*. 34:3-10.
- **THEURETZBACHER, U.** 2009. Future antibiotic scenarios: is the tide starting to turn? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34:15-20.
- **UYAGUARI, M.; SCOTT, G.; NORMAN, S.** 2013. Abundance of class 1-3 integrons in South Carolina estuarine ecosystems under high and low levels of anthropogenic influence. *Marine Pollution Bulletin*. 76: 77-84.
- **VALENZUELA, M.; PRAT, M.; SANTOLAYA, M.; SAKURADA, A.; GARCÍA, P.; GONZÁLEZ, P.; PÉREZ, C.; PRADO, V.; TRIANTAFILO, V.; TRUCCO, O.** 2003. Implementación de una red nacional para la vigilancia de Resistencia de agentes

patógenos a antimicrobianos según síndromes clínicos. Revista Chilena de Infectología. 20:119-125.

- **WALSH, C.** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 406:775-781.
- **WALSH, C.; DUFFY, G.; NALLY, P.; O'MAHONY, R.; MCDOWELL, D.; FANNING, S.** 2008. Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella* Typhimurium DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. Letters in Applied Microbiology. 46:210-215.
- **WANG, G.; WU, C.; DU, X.; SHEN, Z.; SONG, L.; CHEN, X.; SHEN, J.** 2008. Characterization of integron-mediated antimicrobial resistance among *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis. Veterinary Microbiology. 127:73-78.
- **WILKERSON, C.; SAMADPOUR, M.; VAN KIRK, N.; ROBERTS, M.** 2004. Antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and bovines. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48:1066-1067.
- **WRIGHT, G.; POINAR, H.** 2012. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. Trends in Microbiology. 20:157-159.
- **XU, H.; DAVIES, J.; MIAO, V.** 2007. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. Journal of Bacteriology. 189 (17): 6276-6283.