



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**DETECCION DE TRES GENES DE RESISTENCIA A
TETRACICLINAS EN BACTERIAS NOSOCOMIALES GRAM
POSITIVAS, AISLADAS EN RECINTOS HOSPITALARIOS
VETERINARIOS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE**

DENISSE CARRASCO HINOJOSA

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

PROFESOR GUÍA
MARÍA ANTONIETA JARA OSORIO

FINANCIAMIENTO
PROYECTO FIV 4602016
UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO, CHILE
2012



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCION DE TRES GENES DE RESISTENCIA A TETRACICLINAS EN BACTERIAS NOSOCOMIALES GRAM POSITIVAS, AISLADAS EN RECINTOS HOSPITALARIOS VETERINARIOS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

DENISSE CARRASCO HINOJOSA

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DRA. Ma ANTONIETA JARA O.
PROFESOR CONSEJERO: DR. CARLOS NAVARRO V.
PROFESOR CONSEJERO: DR. SERGIO BUCAREY V.

SANTIAGO, CHILE
2012

INDICE

Página

RESUMEN	iv
SUMMARY	v
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	2
1. INFECCIONES NOSOCOMIALES	2
1.1 Factores predisponentes de infección nosocomial	2
1.2 Sitios de infección nosocomial	3
1.3 Vigilancia y control de infecciones nosocomiales	4
2. ANTIMICROBIANOS.....	5
2.1 Mecanismos de acción antibacteriana	5
3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	5
3.1 Mecanismos de resistencia a agentes antibacterianos	7
3.2 Genética de la resistencia antibióticos	7
4. TETRACICLINAS	10
4.1 Descubrimiento y desarrollo.....	10
4.2 Estructura	10
4.3 Modo de acción	10
4.4 Interacción ribosomal	11
4.5 Resistencia de tetraciclinas.....	11
4.6 Elementos genéticos móviles.....	13
III. OBJETIVOS	14
1. OBJETIVO GENERAL	14
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
1. Muestras.....	15
2. Obtención de ADN bacteriano	15
3. Detección de genes de resistencia a tetraciclina mediante PCR	15
4. Medidas de bioseguridad	17

V. RESULTADOS	18
1. Detección de los genes <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i> , mediante técnica de PCR convencional, en bacterias ambientales descritas como nosocomiales	18
VI. DISCUSION.....	20
VII. CONCLUSIONES.....	24
VIII. ANEXOS.....	25
IX. BIBLIOGRAFIA.....	28

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1:	Partidores utilizados en el protocolo de PCR según genes de resistencia antimicrobiana.....	17
CUADRO 2:	Protocolos de PCR para genes de resistencia antimicrobiana.	17
CUADRO 3:	Cepas bacterianas Gram positivas según aislado, especie, sensibilidad a tetraciclinas y doxiciclinas y presencia de genes <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> y <i>tet(O)</i>	19
CUADRO 4:	Número de muestras y su composición (%).	26
CUADRO 5:	Distribución de aislados nosocomiales Gram positivos, según especie.	26
CUADRO 6:	Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de los 35 aislados bacterianos nosocomiales Gram positivos con R o SI a tetraciclinas.	27
CUADRO 7:	Descripción del hospital veterinario, sector y lugar de donde fueron obtenidas las muestras de los 35 aislados bacterianos nosocomiales Gram positivos.	28

RESUMEN

Las infecciones nosocomiales y la resistencia antimicrobiana, constituyen una problemática mundial en el área de la salud pública, ambas se interrelacionan ya que las bacterias asociadas con infecciones nosocomiales son a menudo resistentes a los antibióticos, siendo cada vez más frecuente el fenómeno de la multiresistencia en las cepas involucradas.

Entre los antimicrobianos, ampliamente usados en medicina veterinaria, que han visto reducida su efectividad se encuentra el grupo de las tetraciclinas, fármacos de amplio espectro utilizados con diferentes fines terapéuticos. Las bacterias resistentes son capaces de transmitir y adquirir genes de resistencia antimicrobiana, en el caso de las bacterias resistentes a tetraciclinas estas presentan genes denominados *tet*, describiéndose en la actualidad 43 genes *tet* que codifican, principalmente, proteínas de eflujo activo y proteínas de protección ribosomal.

El objetivo de este trabajo fue la detección de tres genes de resistencia a tetraciclinas-*tet(K)*, involucrados en la generación de proteínas de eflujo y *tet(M)* y *tet(O)*, involucrados en la generación de proteínas de protección ribosomal, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en cepas bacterianas Gram positivas ambientales descritas como nosocomiales, previamente aisladas y caracterizadas en los años 2007 y 2008, desde unidades clínicas Veterinarias de la Universidad de Chile.

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

SUMMARY

Nosocomial infections and antimicrobial resistance represent a worldwide public health problem. Both interact between each other since the bacteria associated to nosocomial infections are usually resistant to antibiotics, being the multiresistance an increasingly frequent phenomenon among involved microbial strains.

In the field of veterinary medicine, one of the most frequently used antimicrobial that has shown a reduced effectiveness is the Tetracycline, a broad-spectrum antibiotic utilized for different therapeutic goals. Resistant bacteria are capable of transmitting and acquiring antimicrobial resistant genes, and particularly tetracycline resistant bacteria present a group of genes named *tet*. Currently, there have been 43 *tet* genes described, which code mainly active efflux proteins and ribosomal protective proteins.

The main goal of this work was the detection of three tetracycline resistant genes; *tet(K)*, involved in the production of efflux proteins, as well as *tet(M)* and *tet(O)*, involved in the production of ribosomal protective proteins, using PCR in previously isolated environmental Gram positive bacterial strains described as nosocomial from veterinary clinical units of the Universidad de Chile.

The implementation of this molecular biology technic allowed us to identify among phenotypical resistant strains through agar diffusion antibiogram, at least one of the three tetracycline resistance genes. Moreover, in a high percentage of mild resistance strains and in some tetracycline sensible strains, at least one resistance gene was detected.

I. INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas constituyen actualmente una importante problemática a nivel mundial y son, sin duda, una de las razones principales que han motivado las investigaciones de las ciencias biomédicas a lo largo de la historia. Si bien esta gran motivación ha dirigido la búsqueda para resolver, prevenir y/o controlar este estado patológico, también el ser humano ha adoptado medidas de contención como la creación de recintos hospitalarios y la terapia antimicrobiana. Es importante destacar que estos avances han permitido beneficios en la población, tanto enferma como sana y han traído consigo consecuencias en relación al surgimiento de infecciones nosocomiales y de la resistencia antimicrobiana. Lo anterior se interrelaciona al considerar que las bacterias asociadas con infecciones nosocomiales son a menudo resistentes a los antibióticos y particularmente a los antibióticos utilizados con más frecuencia en las dependencias hospitalarias.

Los factores que contribuyen al incremento de la incidencia de las infecciones nosocomiales en hospitales humanos están comenzando a ser cada vez más comunes en medicina veterinaria. Entre estos factores se incluyen la hospitalización prolongada, el manejo o prácticas en las unidades de cuidados intensivos, el uso de dispositivos invasivos (catéter intravenoso y urinario) y el incremento en el uso de drogas antimicrobianas. Así, el uso generalizado de antibióticos, ha provocado la selección de bacterias resistentes, causando limitaciones en la terapia antimicrobiana.

En este contexto, entre los antibióticos ampliamente usados en medicina veterinaria se encuentran las tetraciclinas, que si bien constituyen una familia de antibióticos de amplio espectro de acción y de utilidad en la práctica médica, han visto limitada su actividad por la presencia de bacterias resistentes, que además son capaces de transmitir y adquirir genes de resistencia antimicrobiana de forma altamente eficaz.

En consideración a lo anterior, en esta Memoria de Título se detectaron tres genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias nosocomiales ambientales Gram positivas, aisladas en los hospitales veterinarios de la Universidad de Chile contribuyendo a las investigaciones de infecciones nosocomiales en el área veterinaria, con la finalidad de poseer mejores herramientas a la hora de realizar tratamientos con antimicrobianos en los pacientes que recurren a los recintos hospitalarios veterinarios.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. INFECCIONES NOSOCOMIALES

Las infecciones nosocomiales (del griego *nosos*, enfermedad y *komeo*, tratar) corresponden a aquellas infecciones que son adquiridas dentro de un recinto hospitalario y cuya manifestación, dependiendo del período de incubación de la infección, puede presentarse 48-72 horas después, o incluso una vez dado de alta el paciente (Organización Mundial de la Salud, 2003).

Tanto las infecciones nosocomiales como la resistencia a los antimicrobianos son temas que han sido intensamente estudiados en medicina humana, debido a los grandes problemas que generan en los recintos hospitalarios. En medicina veterinaria, el interés por su conocimiento ha aumentado en los últimos años debido a que aún persiste la práctica de los tratamientos empíricos, sin estudios de susceptibilidad antimicrobiana, lo que ha significado un aumento en la aparición de resistencia contribuyendo al problema ya existente en Salud Pública (Gaschen, 2008; Johnson, 2002).

Estas infecciones se presentan tanto en países desarrollados como en otros carentes de recursos y constituyen una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en pacientes hospitalizados, ocasionando altos costos económicos, donde el principal factor lo constituye la estadía prolongada de los pacientes infectados. Estas infecciones se observan moderadamente entre los pacientes humanos hospitalizados (5% - 10%), cifra que aún no ha sido establecida para los hospitales veterinarios. Sin embargo, se estima que los factores que contribuyen a incrementar la presentación de las infecciones nosocomiales son comunes para ambos tipos de pacientes. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales pueden ser transmitidos a la comunidad por los pacientes después del alta hospitalaria, por el personal de atención de salud y por los visitantes (Johnson, 2002).

1.1 Factores predisponentes de infección nosocomial

Los factores que influyen en la manifestación de las infecciones nosocomiales son:

a) Agente microbiano

El contacto entre el paciente y el microorganismo, en sí, no produce necesariamente una enfermedad clínica. La posibilidad de infección depende, en parte, de las características de los microorganismos, como la virulencia intrínseca además de la cantidad de material infeccioso (inóculo). Una gran cantidad de bacterias, virus, hongos y parásitos pueden causar infecciones nosocomiales.

Los patógenos comúnmente asociados con infecciones nosocomiales veterinarias son cocos Gram positivos (*Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.), miembros de la familia

Enterobacteriaceae y bacilos Gram negativos no fermentadores (*Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*).

b) Paciente

Entre los factores de los pacientes que influyen en la posibilidad de contraer una infección se encuentran la edad, el estado de inmunidad, cualquier enfermedad subyacente y las intervenciones quirúrgicas ya sean diagnósticas y/o terapéuticas. Así, muchas de las infecciones nosocomiales son originadas por microorganismos normalmente inocuos, como aquellos que forman parte de la flora bacteriana normal de humanos y animales que pueden llegar a ser patógenos cuando se ven comprometidas las defensas inmunitarias del organismo (Organización Mundial de la Salud, 2003).

c) Factores ambientales

Los microorganismos pueden ser contraídos desde otra persona del hospital (infección cruzada) y en el caso de los hospitales veterinarios, los animales internados juegan también un rol importante como reservorios. Los microorganismos también pueden ser adquiridos desde la propia flora del paciente (infección endógena) o provenientes de un objeto inanimado (infección ambiental), demostrándose que los patógenos nosocomiales persisten en lugares como bañeras, endoscopios, laringoscopios manuales, estetoscopios, teclados de computadores, llaves de agua y termómetros (Organización Mundial de la Salud, 2003).

d) Resistencia bacteriana

La amplia aparición de antimicrobianos en la práctica médica humana y veterinaria, el uso de antibióticos en la agricultura (particularmente producción lechera y de carne) y el uso de antisépticos y desinfectantes, generan presión selectiva sobre las bacterias, potenciando la supervivencia de las cepas multiresistentes a antimicrobianos. Este uso generalizado para tratamiento o profilaxis, es el principal factor determinante de la aparición de resistencia. La resistencia a múltiples drogas ha sido demostrada en organismos nosocomiales tanto en hospitales humanos como veterinarios y es factible de encontrar en pacientes con y sin tratamiento previo de antibiótico, siendo menos común en estos últimos (Johnson, 2002; Ogeer-Gyles *et al.*, 2006).

1.2 Sitios de infección nosocomial

En medicina veterinaria el sitio quirúrgico, el sistema circulatorio, el tracto respiratorio y el tracto urinario conforman el 80% de los sitios de infección nosocomial. A menudo, el desarrollo de infecciones por estos organismos está asociado al uso de dispositivos como catéteres intravenosos y urinarios, tubos endotraqueales e instrumental quirúrgico que sobrepasan las barreras mecánicas naturales del paciente e introduce bacterias dentro del cuerpo normalmente estéril. En cuanto a la literatura publicada, la mayoría de las infecciones nosocomiales son identificadas en el sitio quirúrgico o en el tracto urinario (Ogeer-Gyles *et al.*, 2006). Así, es frecuente encontrar aislados resistentes de *Staphylococcus intermedius* en lesiones de piel y *E. coli* resistentes en infecciones del tracto urinario, además de otros

patógenos nosocomiales de presentación frecuente como *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* y *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SARM) (Umber y Bender, 2009).

1.3 Vigilancia y control de infecciones nosocomiales

De acuerdo a la información disponible, la resistencia a los antibióticos parece inevitable. Esta situación ha llevado a realizar continuos esfuerzos para ejercer control sobre el uso de antibióticos y a lo largo de los años, se han propuesto diferentes soluciones por expertos conocedores y por los grupos de mayor importancia en salud internacional. Entre las acciones propuestas, están los controles estrictos sobre el uso de antibióticos en los seres humanos, como es su venta sólo con receta médica, para impedir su mal uso en infecciones no bacterianas y reducir así, el uso innecesario de estas drogas. Otra de las acciones planteadas es controlar el uso terapéutico de los antibióticos en la ganadería y la agricultura. Sin embargo, si existiesen restricciones y normas para el uso de antibióticos y nuevos antibióticos semisintéticos, estructuralmente diseñados para ser refractarios a los mecanismos de resistencia, se podría esperar una mejora significativa y duradera en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Davies y Davies, 2010).

Los cultivos de vigilancia epidemiológica y la tipificación molecular han sido importantes aportes de la Microbiología Clínica al control de la infección nosocomial. Múltiples estudios han demostrado que es útil realizar cultivos de vigilancia epidemiológica para conocer la verdadera dimensión del problema de la multiresistencia en un centro o en una unidad médica, pues la información que puede inferirse de los resultados de los cultivos de muestras clínicas obtenidas con fines diagnósticos sólo representa una parte (con frecuencia la menor) del problema. Estos estudios deben considerarse una herramienta adicional en los programas de control de la transmisión nosocomial de estos microorganismos (Cano *et al.*, 2008).

La instauración de un proceso de vigilancia para supervisar la tasa de incidencia de infecciones nosocomiales es un primer paso indispensable para puntualizar los problemas y prioridades locales y evaluar la eficacia de la actividad de control, ya que esta tasa es un indicador de la calidad y seguridad de la atención. La vigilancia, en sí, es un proceso eficaz para reducir la frecuencia de infecciones nosocomiales (Organización Mundial de la Salud, 2003).

En el caso de la prevención de las infecciones nosocomiales se debe realizar un programa que incluya la limitación de la transmisión de microorganismos entre los pacientes que reciben atención directa por medio de prácticas apropiadas de lavado de las manos, uso de guantes y asepsia, estrategias de aislamiento, esterilización, desinfección y lavado de la ropa; control de los riesgos ambientales de infección; protección de los pacientes con el uso apropiado de antimicrobianos profilácticos, nutrición y vacunación; limitación de los riesgos de infecciones endógenas con reducción al mínimo de los procedimientos invasivos y fomento del uso óptimo de antimicrobianos; vigilancia de las infecciones e identificación y control de brotes;

prevención de la infección de los miembros del personal y mejoramiento de las prácticas de atención de pacientes (Organización Mundial de la Salud, 2003).

2. ANTIMICROBIANOS

El descubrimiento de los antibióticos, su modo de acción y los mecanismos de resistencia antimicrobiana han sido temas productivos de investigación académica. El término genérico de antibiótico es usado para denotar cualquier clase de molécula orgánica que inhibe o mata microbios por interacciones específicas con los blancos bacterianos, sin ninguna consideración del origen o clase del compuesto en particular. En la actualidad, el descubrimiento de los antibióticos es considerada uno de los eventos más significativos relacionados con la salud (Demain y Sánchez, 2009).

Para que los antimicrobianos ejerzan acción en los organismos vivos deben ser capaces de afectar solo las células procarióticas y reconocer en ellas su molécula blanco antes de ser inactivadas o expulsadas fuera de ellas. Atendiendo a su efecto antibacteriano los antimicrobianos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (solo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). Cada grupo de antibióticos actúan preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático (Calvo y Martínez, 2009).

2.1 Mecanismos de acción antibacteriana

- a) Interferencia con la síntesis de la pared celular. Ej. β -lactámicos y glucopéptidos.
- b) Alteración de la integridad de la membrana citoplasmática. Ej. Polimixinas.
- c) Inhibición de la síntesis proteica,
 - Inhibidores de la fase de activación: Mupirocina.
 - Inhibidores del inicio de la síntesis proteica: Aminoglucósidos.
 - Inhibidores de la fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma: Tetraciclinas
 - Inhibidores de la elongación: Macrólidos
- d) Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos: Quinolonas.
- e) Inhibición de vías metabólicas: Trimetoprim - sulfametoxazol (Tenover, 2006; Calvo y Martínez, 2009).

3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

El uso exitoso de cualquier agente terapéutico se ve comprometido por el potencial desarrollo de tolerancia o resistencia a estos compuestos desde el primer momento de uso. Esto es real para agentes utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas, fúngicas, parasitarias y virales, aplicándose a cualquier enfermedad sufrida por algún organismo vivo, incluyendo humanos, animales, peces, plantas, insectos, etc (Davies y Davies, 2010).

Los mecanismos moleculares de la resistencia a antibióticos han sido ampliamente estudiados y han involucrado investigaciones de genética y bioquímica desde diferentes facetas de la función celular bacteriana. De hecho, el estudio de la acción de los antibióticos y la resistencia ha contribuido significativamente a los conocimientos de la estructura y función celular. Los procesos de resistencia están ampliamente distribuidos en el reino microbiológico y han sido bien descritos en bacterias comensales y patógenas. La mayoría de la resistencia puede ser diseminada por uno o más mecanismos de transferencia de genes (Davies y Davies, 2010; Liu y Pop, 2009).

La resistencia a los antimicrobianos puede considerarse desde dos puntos de vista: el biológico y el clínico. La secuenciación de los genomas completos de decenas de bacterias sugiere que todos los microorganismos poseen algún grado de resistencia natural a uno o más grupos de antimicrobianos, ya sea porque hay genes que codifican mecanismos de resistencia de mayor o menor eficacia o porque no existe la molécula blanco para la acción de ciertos antibióticos. Al considerar que esta resistencia natural es predecible (por la abundante información disponible al respecto) su importancia clínica es relativa, pues el clínico cuenta con ella a la hora de planificar la atención del paciente infectado. Por lo tanto, resulta de mayor interés la resistencia adquirida como consecuencia de mutaciones en genes que ya tiene la bacteria o cuando adquiere un gen de resistencia procedente de otro microorganismo (Martínez, 2006).

El estrecho contacto entre las mascotas y los humanos otorga condiciones favorables para la transmisión de bacterias, ya sea por contacto directo (caricias, lamido, lesiones físicas, etc.) o a través del entorno doméstico (contaminación de los alimentos, muebles, etc.). Esta situación también ocurre en clínicas veterinarias en donde se establece una relación constante entre los pacientes (mascotas) y el personal. La transferencia horizontal de genes de resistencia puede ocurrir en ambas direcciones de mascotas a humanos y de humanos a mascotas. Por ejemplo, bacterias humanas transmitidas a mascotas pueden adquirir genes de resistencia desde la flora comensal de éstas y pueden ser seleccionadas por tratamientos con antimicrobianos en esos animales. Por lo tanto, las mascotas tienen el potencial de contribuir a la propagación de bacterias resistentes adquiridas a los humanos y al ambiente (Lloyd, 2007; Guardabassi *et al.*, 2004; Umber y Bender, 2009).

El rol predominante de las actividades humanas en la generación de reservorios ambientales de resistencia a antibióticos ya ha sido aceptado. Desde 1940, la cantidad de antibióticos de aplicación en humanos liberados al ambiente ha ido en aumento, lo cual provee una mantenida presión de selección sobre poblaciones de cepas resistentes en todos los ambientes. Obtener una cantidad exacta de antimicrobianos producidos por la industria farmacéutica es difícil, pero puede ser estimado considerando que varios millones de toneladas de antibióticos han sido liberados a la biosfera durante el último medio siglo (Teuber, 2001).

Con la finalidad de aunar expresiones utilizadas de forma frecuente en temas de resistencia antimicrobiana, algunos autores han creado términos como (1) *superbacterias*, definiéndolas como bacterias que poseen mutaciones múltiples que les otorgan altos niveles de resistencia a los antibióticos específicamente recomendados para su tratamiento y (2) *resistoma* como la colección de todos los genes de resistencia a antibióticos y sus precursores en bacterias patógenas y no patógenas (Davies y Davies, 2010; Wright, 2007).

3.1 Mecanismos de resistencia a agentes antibacterianos

En relación a los mecanismos de resistencia, se han descrito a lo menos cuatro, pudiendo una cepa bacteriana utilizar uno, varios combinados o todos. Estos mecanismos reconocidos son: **1) Inactivación de la droga** mediante la producción de enzimas que la degraden (Ej.: betalactamasas); **2) Modificación de la molécula objetivo** de manera tal que ya no es significativamente afectada por la droga (Ej.: proteínas fijadoras de penicilina [PBPs]), o bien, alternativamente, la producción de dicha molécula puede estar amplificada a niveles tales que la dosis es insuficiente; **3) Exclusión intrínseca** gracias a la existencia de una barrera de permeabilidad reducida que evita la entrada del compuesto activo a la célula bacteriana (Ej.: la lipofilidad de la pared celular del género *Mycobacterium*); **4) Eflujo activo de la droga**, es un tipo especial de exclusión en el que la molécula que inicialmente ingresa a la célula bacteriana a través de la membrana celular es transportada de vuelta al medio extracelular (Jenkinson, 1996; Tenover, 2006).

3.2 Genética de la resistencia antibióticos

El descubrimiento de la presencia de supuestas secuencias de genes bacterianos en genomas eucariotes ha aumentado la conciencia de la gran importancia de la transferencia horizontal de genes (THG) en la evolución del genoma. Consecuentemente, se han revelado otros aspectos de la transferencia de genes por la identificación y distribución de islas genómicas que llevan genes de patogenicidad y otros grupos de genes funcionales de diferentes géneros bacterianos (Hacker y Kaper, 2000; Norman *et al.*, 2009).

Durante el uso terapéutico, la exposición de los patógenos bacterianos a altas concentraciones de antibióticos por períodos prolongados genera una presión de selección severa y conduce a mayores niveles de resistencia. La vía en que un gen del medio ambiente pasa a ser un gen de resistencia clínica, no se conoce, pero es obvio que se produce con cierta facilidad (Guerin *et al.*, 2010; Guerin *et al.*, 2009).

Los cambios genéticos que confieren a las bacterias resistencia a los antibióticos, a través del cambio en su material genético se puede hacer por dos vías: 1) Mutaciones que modifican el ADN preexistente de las células. Estas alteraciones implican cambios, deleciones e inversiones en las bases del ADN que involucran un cambio en el material genético, pero no implican la adquisición de un nuevo ADN al genoma celular. 2) Por adquisición de nuevo material genético, que involucra la captura de nuevos genes dentro de la célula el cual

expande el genoma. Este mecanismo es el mayor responsable, aunque no exclusivo, del desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, las cuales causan infecciones de humanos y animales (Bennett, 2008).

a) Transmisión y adquisición de genes de resistencia

Dentro de los elementos genéticos móviles encontramos dos tipos: 1) elementos que pueden moverse desde una célula bacteriana a otra, las cuales en término de resistencia a antibióticos incluyen plásmidos resistentes y transposones resistentes conjugativos y 2) elementos que pueden moverse desde una locación genética a otra en la misma célula. Estos últimos elementos incluyen, transposones resistentes, cassettes génicos e *ISCR* “*Insertion sequence common region*”. Los plásmidos y los transposones conjugativos se transfieren desde una célula a otra por mecanismos que involucran replicación. Los transposones, cassettes génicos e *ISCR* median la transferencia de genes entre sitios en el mismo o en diferentes moléculas de ADN requiriendo formas de recombinación, los cuales pueden o no incluir formas de replicación. Los genes de resistencia a antibióticos se acumulan en plásmidos como una consecuencia de las actividades de estos últimos tres sistemas de recombinación (Bennett, 2008).

- **Plásmidos bacterianos**

Los plásmidos son el mejor concepto de un cromosoma pequeño, auxiliar y prescindible. En general, ellos existen de forma separada y replican independientemente del cromosoma bacteriano, aunque la mayoría de las funciones de replicación son proporcionadas por la célula hospedera. No todos los plásmidos pueden promover su propia transferencia de una bacteria a otra; los plásmidos conjugativos (algunos de los cuales contienen genes de resistencia) sí lo hacen porque codifican proteínas que aseguran su paso desde bacterias que los contienen a bacterias que carecen de ellos. En ocasiones, se movilizan también plásmidos no conjugativos de resistencia, gracias a su capacidad para aprovechar el proceso de transferencia puesto en marcha por otro plásmido conjugativo que esté en la misma bacteria donante. Luego, los genes plasmídicos pueden diseminarse a otros elementos genéticos o integrarse en el cromosoma bacteriano, asegurando así una mayor estabilidad (Martínez, 2006; Bennett, 2008).

- **Transposones**

Los transposones pertenecen a un set de elementos móviles llamados elementos transponibles que abarcan pequeños elementos ocultos llamados secuencias de inserción (elementos IS), transposones y bacteriófagos transponibles. Los transposones no se pueden replicar, pero codifican una enzima (transposasa) que les permite transferirse entre diferentes elementos del genoma bacteriano. Estos elementos tienen la habilidad de moverse intra e inter molecularmente, ellos pueden saltar desde un sitio a otro dentro de la misma molécula de ADN o desde una molécula de ADN a otra, por ejemplo desde un plásmido a otro o desde un plásmido a un cromosoma bacteriano y viceversa. Algunos transposones son conjugativos y

pueden transferirse entre cromosomas de 2 bacterias distintas; son, sobre todo, importantes en enterococos (resistencia a tetraciclinas y glucopéptidos). Los transposones no conjugativos pueden integrarse en plásmidos transferibles y lograr también su diseminación entre microorganismos. (Bennet, 2008; Hegstad *et al.*, 2010).

- **Integrones y cassettes génicos**

Los integrones bacterianos son sistemas de captura de genes que utilizan sitios específicos de recombinación, en lugar de mecanismos de transposición. Ellos abarcan un sistema de recombinación especializado consistente de un gen *int*, el cual codifica una enzima de recombinación sitio específica llamada integrasa y de un sitio con una corta secuencia de ADN llamada cassette génico, porque la mayoría aloja un solo gen que son insertados por las integrasas. En el proceso de movimiento desde un integron a otro o desde un sitio en un integron a otro en el mismo integron, un cassette génico existe como una pequeña y autónoma molécula de ADN de doble hebra circular no replicativa. Los integrones no pueden realizar autotransposición pero se asocian frecuentemente a secuencias de inserción o bien, a transposones y plásmidos conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión inter e intra especie. Los integrones han sido encontrados frecuentemente en cepas de origen nosocomial. (Bennett, 2008; Gonzáles *et al.*, 2004).

- **Transferencia de genes mediada por ISCR**

Aspectos de la evolución de los plásmidos están basados en un set de elementos genéticos móviles denominados elementos ISCR. Los elementos ISCR son actualmente reconocidos como poderosos sistemas de captura y movimiento de genes de resistencia a antibióticos, también son capaces de construir extensos *cluster* de genes de resistencia en plásmidos y cromosomas. Los elementos ISCR están estrechamente relacionados con una inusual familia de secuencias de inserción llamada familia IS91 (Toleman *et al.*, 2006).

b) Detección de genes de resistencia

Cabe señalar que los estudios de los mecanismos de resistencia a los antibióticos y sus correspondientes mecanismos de transferencia de genes de patógenos han desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de métodos de ADN recombinante, proporcionando la base experimental para la industria de la biotecnología moderna (Smillie *et al.*, 2010). Debido a esto los métodos de genotipificación para la detección de genes de resistencia a antibióticos son altamente requeridos por su rapidez, precisión y sensibilidad para la detección de genes de resistencia en un amplio rango de bacterias patógenas y comensales en muestras clínicas y ambientales (Aminov *et al.*, 2004).

Dentro de los métodos de genotipificación, utilizados para la detección de genes de resistencia a antibióticos, se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollada por Kary Mullis en 1983. Esta reacción es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de

cebadores o partidores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN. La PCR no es sólo una técnica exquisitamente específica, sino también muy sensible, pues en principio para practicarla bastaría una sola molécula (Mullis y Faloona, 1987; Rodríguez y Barrera, 2004).

4. TETRACICLINAS

Las tetraciclinas son una familia de antimicrobianos con amplio espectro de acción, exhiben actividad contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, clamidias, micoplasmas y rickettsias, siendo también utilizadas contra parásitos protozoarios. Las propiedades antimicrobianas y la ausencia de efectos adversos de éstas, ha permitido su uso extensivo en la terapia de infecciones humanas y animales. Estos fármacos, también han sido utilizados como aditivo alimentario en animales de abasto para actuar como promotores del crecimiento. (Roberts, 2003; Roberts, 2005; Chopra y Roberts, 2001).

4.1 Descubrimiento y desarrollo

Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales, derivados de diferentes especies de *Streptomyces* y productos que son derivados semisintéticos. Fueron descubiertas por Duggar en 1940 (Duggar, 1948) y comenzaron a ser utilizadas desde 1950 hasta la fecha.

Las tetraciclinas se han clasificado en tres generaciones, de acuerdo con el orden de descubrimiento, de las propiedades farmacocinéticas y del espectro de actividad antimicrobiana. La primera generación, lo constituyen los agentes más antiguos, tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, chelocardín, demeclociclina, limeciclina, metaciclina y rolitetraciclina. En la segunda generación, se incluyen doxiciclina y minociclina. Y finalmente en la tercera generación, se incluyen las tigeciclina y nuevos compuestos en desarrollo como las aminometilciclinas (BAY73-6944 / PTK-0796) (Chopra y Roberts, 2001; Michalova *et al.*, 2004; Agwuh y McGowan, 2006; Mella y Muñoz, 2009).

4.2 Estructura

Están estructuradas por un núcleo de conformación tetracíclica lineal, compuesta por cuatro anillos bencénicos fusionados al que se pueden unir distintos radicales que darán lugar a diferentes moléculas de tetraciclinas. Todas forman complejos quelantes con distintos cationes, como calcio, magnesio o hierro (Vicente y Perez-Trallero, 2010; Calvo y Martínez, 2009).

4.3 Modo de acción

Los compuestos de uso clínico presentan actividad bacteriostática y su modo de acción ha sido bien caracterizado. La función antimicrobiana de las tetraciclinas se inicia una vez que

estas ingresan al espacio citoplasmático de las bacterias, uniéndose de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma, inhibiendo la síntesis proteica, al bloquear el acceso de los complejos aminoacil-ARNt al sitio A del complejo ribosomal (Michalova *et al.*, 2004; Brodersen *et al.*, 2000; Connell *et al.*, 2003).

Las tetraciclinas para interactuar con su molécula blanco necesitan atravesar uno o más sistemas de membrana dependiendo si el organismo susceptible es una bacteria Gram-positiva o Gram- negativa (Chopra y Roberts, 2001; Nikaido y Thanassi, 1993).

4.4 Interacción ribosomal

La interacción tetraciclina ribosoma ha sido extensamente estudiado desde 1960 a través de análisis bioquímicos *in vitro*. Varios estudios han indicado una alta afinidad individual de las tetraciclinas a la subunidad ribosomal 30S, unión dependiente de las proteínas S3, S7, S8, S14 y S19, siendo S7 el principal blanco identificados en los estudios y también dependiente de las bases del 16S rRNA, G693, A892, U1052, C1054, G1300 y G1338 que contribuyen a esta estrecha unión. Pero aún se mantienen muchas preguntas sin responder acerca de como impiden las tetraciclinas la unión del aminoacil-ARNt al sitio A o si interactúa con el ARN o con las proteínas del ribosoma (Oehler *et al.*, 1997; Chopra y Roberts, 2001; Zakeri y Wright, 2008; Pioletti *et al.*, 2001).

4.5 Resistencia de tetraciclinas

La acción de las tetraciclinas de inhibición de la síntesis proteica, combinado con la estructura versátil que le permite atravesar la membrana biológica con facilidad, es la clave del amplio espectro de actividad de este grupo de antibióticos. En consecuencia, su uso extensivo ha llevado a la selección de organismos resistentes involucrando a bacterias patógenas y comensales, lo cual ha limitado gravemente las aplicaciones clínicas de esta droga (Zakeri y Wright, 2008).

El interés por establecer los mecanismos de los determinantes genéticos de resistencia y las bases moleculares de estos mecanismos, ha sido desencadenado por el incremento en la resistencia bacteriana a tetraciclinas. Los estudios están orientados a identificar la forma de inhibir los mecanismos de resistencia a tetraciclinas y de esta forma poder restaurar la actividad antimicrobiana de las tetraciclinas (Chopra y Roberts, 2001).

La resistencia a tetraciclinas en la mayoría de las bacterias se debe a la adquisición de nuevos genes; los genes relacionados a las tetraciclinas se encuentran entre los determinantes de resistencia más comúnmente encontrados entre las bacterias. Ellos usualmente se encuentran asociados con elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones, que a menudo son conjugativos (Roberts, 2005).

Se describen cuatro mecanismos de resistencia a las tetraciclinas: **1) Proteínas de eflujo activo**, que reducen las concentraciones intracelulares de tetraciclinas; **2) Proteínas de protección ribosomal**, las tetraciclinas se unen al ribosoma cambiando su conformación, interrumpiendo la elongación, deteniendo así la síntesis proteica; **3) Inactivación enzimática**; **4) Mecanismo desconocido**. De éstos, las proteínas de eflujo activo y las proteínas de protección ribosomal son las formas de resistencia más comunes de encontrar entre bacterias patógenas y ambientales (Michalova *et al.*, 2004; Zakeri y Wright, 2008).

Actualmente se han identificados 43 genes de resistencia a tetraciclinas, designados como genes *tet* y *otr*. De estos, 27 genes codifican proteínas de eflujo, 12 genes codifican proteínas de protección ribosomal, 3 genes codifican enzimas de inactivación y 1 gen de mecanismo desconocido. En forma frecuente, nuevos aislados resistentes se informan en diferentes partes del mundo, por lo tanto, es esperable que esta lista aumente en el futuro (Roberts, 2010).

a) Proteínas de Eflujo Activo

El eflujo activo de tetraciclinas es el mecanismo de resistencia más eficiente y más relevante clínicamente. Estos genes codifican proteínas pertenecientes a la familia de proteínas MFS (“major facilitator superfamily”). En el caso de las tetraciclinas al ser un sistema de expresión sencilla aunque altamente eficaz, estas proteínas pueden conferir resistencia incluso en presencia de grandes cantidades de tetraciclinas. El eflujo de las tetraciclinas es mediado por bombas de eflujo dependientes de energía, estas proteínas localizadas en la membrana citoplasmática, intercambian un protón (H^+) por un complejo monocatiónico de tetraciclina- Mg^{2+} , reduciendo de esta forma la cantidad de antibiótico en el citoplasma (Chopra y Roberts, 2001; Paulsen, 2003; Mahamoud *et al.*, 2007; Poole, 2007).

b) Proteínas de Protección Ribosomal (PPRs)

Las PPRs representan una clase de determinantes de resistencia que se encuentran en una amplia variedad de bacterias. Estas son proteínas citoplasmáticas solubles que protegen al ribosoma de la acción de las tetraciclinas (Zakeri y Wright, 2008; Connell *et al.*, 2003).

La resistencia tetraciclinas se logra al debilitar la interacción de tetraciclina y ribosoma con la subsecuente liberación del antibiótico. Esto permite liberar al ribosoma de los efectos inhibitorios de la droga, de manera que el aminoacil-RNAt puede unirse al sitio A y la síntesis proteica puede continuar. Por este mecanismo, las bacterias exhiben resistencia contra la primera y segunda generación de tetraciclinas, pero no contra los componentes de tercera generación. De hecho, tigeciclinas han mostrado efectiva actividad antibacteriana contra ribosomas protegidos con Tet(M) posiblemente debido a la fuerte unión de la droga al sitio blanco (Connell *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 1994).

PPRs representan una amplia distribución de clases de determinantes de resistencia. Se han descrito 12 tipos de PPRs presentes en géneros bacterianos Gram-positivos y Gram-negativos. Tet(O) y Tet(M) son las clases más prevalentes y mejor estudiadas de PPRs. Mientras Tet(M) es detectado en 24 géneros, Tet(O) es encontrado en 8 diferentes géneros bacterianos (Roberts, 2010; Wright, 2010; Abril *et al.*, 2010).

4.6 Elementos genéticos móviles

Los genes *tet* a menudo se encuentran asociados con plásmidos, transposones y transposones conjugativos los cuales pueden portar otros genes de resistencia a antibióticos o a metales pesados. Los integrones han sido identificados en géneros Gram-negativos y en *Staphylococcus* spp., los genes *tet* ya han sido encontrados dentro de integrones (Roberts, 2005; Agerso y Sandvang, 2005).

Los transposones Tn916-Tn1545 son la familia más promiscua de transposones conjugativos descritos, con una amplia variedad de hospederos que incluyen géneros Gram-positivos y Gram-negativos (Roberts, 2005).

a) Bacterias Gram-positivas

Actualmente, en 48 géneros de bacterias Gram-positivas se han descrito y determinado los mecanismos de resistencia a tetraciclinas. Es importante mencionar que no todas las bacterias resistentes a tetraciclinas han sido correlacionadas con los genes *tet* hasta hoy descritos. Un total de 35 géneros llevan el gen *tet*(M), 12 llevan el gen *tet*(K) y 12 llevan el gen *tet*(O) (Roberts, 2010).

Los genes *tet*(K) y *tet*(L) están ampliamente distribuidos entre las especies Gram positivas asociadas con humanos, animales y suelos y han sido encontrados en *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Streptomyces* spp. aislados desde pacientes. El gen *tet*(M) está a menudo asociado con elementos conjugativos de la familia de Tn916-Tn1545. En la mayoría de las especies Gram-positivas, el gen *tet*(M) es encontrado en elementos conjugativos dentro del cromosoma bacteriano. El gen *tet*(O) puede encontrarse en plásmidos conjugativos o en el cromosoma, donde es móvil por si solo cuando se encuentra en plasmidos conjugativos (Chopra y Roberts, 2001; Roberts, 2005).

En Chile, en el ámbito de medicina veterinaria, no existen antecedentes publicados respecto a la detección de genes de resistencia en bacterias nosocomiales. Este estudio, entrega información, de la presencia de genes de resistencia a tetraciclinas en bacterias Gram positivas ambientales, descritas como nosocomiales y respecto, a lo que está sucediendo en nuestros recintos hospitalarios veterinarios, lo cual puede ser incluso, un reflejo de la situación en el país.

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Detectar por PCR los tres genes mayormente asociados a resistencia a tetraciclinas (genes *tet*) en bacterias nosocomiales Gram-positivas aisladas en recintos hospitalarios veterinarios de la Universidad de Chile.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar el gen *tet(K)*, que codifica proteínas de eflujo activo, en bacterias nosocomiales Gram-positivas mediante la técnica de PCR convencional.
- Detectar los genes *tet(M)* y *tet(O)*, que codifican proteínas de protección ribosomal, en bacterias nosocomiales Gram-positivas mediante la técnica de PCR convencional.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el contexto del proyecto FIV 4602016: “Detección de genes de resistencia a antibióticos y biocidas en bacterias nosocomiales aisladas en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile”, realizado 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.

1. Muestras

Se utilizó un número de 35 cepas bacterianas cocáceas Gram positivas, obtenidas en un estudio anterior (Avendaño, 2010), descritas como nosocomiales y fenotípicamente resistentes (R) o con sensibilidad intermedia (SI) a tetraciclinas determinadas mediante antibiograma por difusión de Kirby Bauer, frente a un panel de 11 antimicrobianos que incluyó tetraciclina y doxiciclina (Ver anexo, cuadro 6 y cuadro 7).

2. Obtención de ADN bacteriano

Para la extracción del ADN bacteriano se utilizó un kit comercial de extracción y purificación (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas®), siguiendo las indicaciones del fabricante. Así, a 200 µL de un cultivo bacteriano de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 de MacFarland) se agregaron 400 µL de solución de lisis, incubando a 65° C por cinco minutos, homogenizando manualmente cada 1,5 minutos. Luego, se adicionaron 600 µL de cloroformo (Merk®), mezclando suavemente y se centrifugó a 10.000 rpm por dos minutos (Heraus Sepatech Biofuge®). Enseguida, se colectó la fase superior en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se agregaron 800 µL de solución de precipitación provista por el kit, mezclando nuevamente y centrifugando a 10.000 rpm por dos minutos. El pellet obtenido fue disuelto en 100 µL de NaCl (1.2 M). A esta mezcla se adicionaron 300 µL de etanol frío manteniéndola a -20° C por 10 minutos para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm por cuatro minutos, se eliminó el etanol y el pellet obtenido se disolvió en 100 µL de agua libre de nucleasas (Winkler®).

3. Detección de genes de resistencia a tetraciclina mediante PCR

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL y un protocolo que incluyó las temperaturas, el tiempo estimado para cada etapa y el número de ciclos aplicables, según el gen a detectar.

3.1 Partidores (Cuadro 1)

- Genes *tet(K)*, *tet(M)* y *tet(O)*. La secuencia de los partidores se seleccionó por su alta especificidad, ampliando segmentos de 1159 pb, 1862 pb y 1723 pb, respectivamente (Trzcinski *et al.*, 2000).

CUADRO 1: Partidores utilizados en el protocolo de PCR según genes de resistencia antimicrobiana.

Gen	Partidores	
<i>tet(M)</i>	5' -AGTTTTAGCTCATGTTGATG- 3'	5' -TCCGACTATTTAGACGACGG-3'
<i>tet(O)</i>	5'-AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC-3'	5'-CGGCGGGGTTGGCAAATA-3'
<i>tet(K)</i>	5'-TATTTTGGCTTTGTATTCTTTCAT -3'	5'-GCTATACCTGTTCCCTCTGATAA -3'

3.2 Mezcla de reacción de PCR

Se utilizó un kit comercial (2X PCR Master Mix Fermentas®), que incluye la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl₂. 12.5 µL de este Master Mix se depositaron en un tubo Eppendorf de 0,2 mL, junto a 5 µL de cada uno de los partidores y 5 µL de la muestra de ADN templado, obteniéndose un volumen total de 27.5 µL. Se utilizó un vórtex para asegurar la mezcla de los reactivos.

a. Amplificación del ADN

Se realizó según los siguientes protocolos (Cuadro 2) (Trzcinski *et al.*, 2000).

CUADRO 2: Protocolos de PCR para genes de resistencia antimicrobiana.

Gen	Ciclos	Denaturación inicial	Hibridación	Elongación	Elongación final	Tamaño banda
<i>tet(M)</i>	35	95° C; 60s	50° C; 60s	72° C; 90s	72° C; 300s	1862 pb
<i>tet(O)</i>	35	95° C; 60s	55° C; 60s	72° C; 90s	72° C; 300s	1723 pb
<i>tet(K)</i>	35	95° C; 60s	50° C; 60s	72° C; 90s	72° C; 300s	1159 pb

b. Visualización de los productos amplificados

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2 % en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas®). 5 µL del producto de PCR se mezclaron con 1 µL del producto comercial de carga, 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®), que posee glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol para verificar el progreso de la migración de las bandas de ADN. La mezcla se depositó en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 90 minutos. Se utilizó Hiperladder II (Bioscan) como marcador de peso molecular, que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 2000 pb para facilitar la detección de los fragmentos amplificados. Luego

de la electroforesis, el gel se sometió a incubación en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo ®) y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP ®), y fotografiado con película Polaroid ®.

4. Medidas de bioseguridad

Uso de delantal manga larga y guantes de látex. El proceso de visualización del producto amplificado involucró el uso de bromuro de etidio y un transiluminador de luz UV, por lo cual, al momento de visualizar el gel se utilizó una placa de acrílico y gafas con filtro UV. Posteriormente la eliminación del gel incubado en bromuro de etidio contempló su incineración, pues el compuesto químico tiene, entre otras, propiedades mutagénicas.

V. RESULTADOS

1. Detección de los genes *tet(K)*, *tet(M)* y *tet(O)*, mediante técnica de PCR convencional, en bacterias ambientales descritas como nosocomiales

CUADRO 3: Cepas bacterianas Gram positivas según aislado, especie, sensibilidad a tetraciclinas y doxiciclinas y presencia de genes *tet(K)*, *tet(M)* y *tet(O)*.

Nº	Aislado	Especie	T	D	<i>tet(K)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>
1	051.	<i>E. faecium</i>	R	R		+	
2	076.	<i>E. faecium</i>	R	R		+	
3	082.	<i>E. faecium</i>	R	R			+
4	055.	<i>E. faecium</i>	R	R			
5	083.	<i>E. faecium</i>	R	R	+	+	+
6	061.	<i>E. faecium</i>	R	R		+	
7	087.	<i>E. faecium</i>	R	R			
8	062 s	<i>E. faecium</i>	R	R		+	
9	511 s	<i>E. faecium</i>	R	R			
10	054.	<i>E. faecium</i>	R	R			
11	033-3	<i>E. faecium</i>	SI	R		+	+
12	341.	<i>E. faecium</i>	R	SI		+	
13	356 M	<i>E. faecium</i>	R	R			
14	036 - 1	<i>E. faecium</i>	R	R	+		+
15	001-3	<i>E. faecium</i>	R	R		+	+
16	085.	<i>E. faecium</i>	R	R			
17	358 s	<i>E. faecium</i>	S	SI			
18	034.	<i>E. faecium</i>	R	SI		+	+
19	508-2	<i>E. faecium</i>	R	R		+	+
20	508 M	<i>E. faecium</i>	R	R			
21	060.	<i>E. faecium</i>	S	R			
22	538 s	<i>E. faecium</i>	R	R		+	+
23	317.	<i>E. faecium</i>	SI	S		+	
24	038 - 2	<i>E. faecium</i>	R	R			
25	001.	<i>E. faecium</i>	R	SI		+	
26	003-2	<i>E. faecium</i>	R	R			
27	014 - 1	<i>E. faecium</i>	R	SI			+
28	551 - 1	<i>E. faecium</i>	SI	SI			+
29	520	<i>E. durans</i>	R	S			+
30	031.	<i>E. durans</i>	R	R		+	+
31	548 s	<i>E. durans</i>	R	R			
32	028-1	<i>E. durans</i>	R	S		+	
33	045-1	<i>E. faecalis</i>	SI	R			
34	038.	<i>S.intermedius</i>	R	R		+	
35	078 s	<i>S.intermedius</i>	R	SI		+	

T: Tetraciclina; **D:** Doxiciclina; **R:** Resistencia; **SI:** Sensibilidad Intermedia; **S:** Sensibilidad. (+): Presencia del gen.

Figura 1 : Gel de Agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Amplicones de 1862 pb *tet(M)*; 1723 pb *tet(O)*; 1159 pb *tet(K)*-



Carril	Muestra (contenido)
1	083 <i>E. faecium</i>
2	061 <i>E. faecium</i>
3	051 <i>E. faecium</i>
4	087 <i>E. faecium</i>
5	Control negativo (<i>tet(M)</i> , <i>tet(K)</i>)
6	Hyperladder II (50-2000 pb)
7	Control negativo (<i>tet(O)</i>)
8	520 <i>E. durans</i>
9	031 <i>E. durans</i>
10	085 <i>E. faecium</i>

- El gen *tet(K)* fue detectado en **dos** oportunidades; en 2/22 de las cepas resistentes a tetraciclina y a doxiciclina.
- El gen *tet(M)* detectado en **diecisiete** oportunidades; en 10/22 de las cepas resistentes a tetraciclina y doxiciclina; 2/4 y 4/7 de las cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina y doxiciclina respectivamente; y en 1/2 de las cepas sensibles a doxiciclina.
- El gen *tet(O)* fue detectado en **doce** oportunidades; en 7/22 de las cepas resistentes a tetraciclina y doxiciclina; en 2/4 y 3/7 de las cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina y doxiciclina respectivamente, presentando una de estas cepas sensibilidad intermedia a tetraciclina y doxiciclina; en 1/2 de las cepas sensibles a doxiciclina.
- Los genes *tet(K)*, *tet(M)* y *tet(O)* fueron detectados de forma simultanea en **una** oportunidad; en 1/22 de las cepas resistentes a tetraciclina y doxiciclina.
- Los genes *tet(K)* y *tet(O)* fueron detectados de forma simultanea en **una** oportunidad; en 1/22 de las cepas resistentes a tetraciclina y doxiciclina.
- Los genes *tet(M)* y *tet(O)* fueron detectados de forma simultanea en **seis** oportunidades; en 4/22 de las cepas resistentes a tetraciclina y doxiciclina; en 1/4 y 1/7 de las cepas con sensibilidad intermedia a tetraciclina y doxiciclina respectivamente.

VI. DISCUSION

Actualmente la tenencia de animales de compañía ha aumentado en forma considerable y con ello la preocupación por la prevención y el tratamiento de las enfermedades infecciosas que los afectan. Como consecuencia de estos cambios, los agentes antimicrobianos son cada vez más frecuentemente utilizados en las mascotas, incluyendo preparaciones antimicrobianas específicamente usadas en humanos. En la práctica clínica de pequeños animales, los médicos veterinarios normalmente se enfrentan a situaciones económicas que no permiten la realización de exámenes de laboratorio; de ahí que se realicen terapias antimicrobianas empíricas sin estudios de susceptibilidad que aseguren un buen uso de estas drogas y que, por el contrario, contribuyen al aumento de la resistencia antimicrobiana (Guardabassi *et al.*, 2004).

Así, la resistencia antimicrobiana es un problema complejo que involucra especies bacterianas, mecanismos de resistencia, mecanismos de transferencia genética y reservorios. Diversos estudios han demostrado que el uso de antimicrobianos en animales de abasto contribuye a la selección de cepas resistentes e implica riesgos a humanos por la transmisión de bacterias zoonóticas resistentes, mediante la cadena alimenticia y la indirecta transferencia de genes de resistencia desde animales a humanos. Las bacterias resistentes pueden ser adquiridas por el hombre a través de vías alternativas como la transmisión de persona a persona, la exposición ambiental y la exposición directa a animales (Lloyd, 2007).

Es importante destacar que gran parte de las investigaciones veterinarias relacionadas con el aislamiento de cepas bacterianas nosocomiales y su posterior detección de genes de resistencia, han sido realizadas sobre la base de muestras obtenidas de pequeños animales. En esta Memoria de título, las muestras utilizadas fueron muestras ambientales de hospitales veterinarios, en las cuales se detectaron bacterias descritas como nosocomiales. A los aislados bacterianos nosocomiales se les estudió el perfil de susceptibilidad antimicrobiana y se les detectó los genes de resistencia involucrados en el estudio, con la intención de obtener una aproximación a la realidad en que se encuentran los hospitales veterinarios en cuanto a infecciones nosocomiales. A la hora de establecer comparaciones entre los resultados de este estudio con investigaciones previas, lo importante a considerar no es el origen de los aislados, es decir ambientales o comensales, sino los patrones de resistencia antimicrobiana y los genes de resistencia detectados en las especies bacterianas (Lloyd, 2007; Jackson *et al.*, 2010).

Algunas investigaciones previas indican que aislados bacterianos nosocomiales que presentan resistencia a tetraciclinas también poseen perfiles de susceptibilidad de multiresistencia, situación observada también en esta Memoria de título, revelando que del total de los aislados resistentes a tetraciclinas el 65% (23/35) presentaron multiresistencia (Lloyd, 2007; Guardabassi *et al.*, 2004).

En relación a las cepas aisladas en esta Memoria de Título, se concuerda con trabajos anteriores que muestran que enterococos y estafilococos son las de mayor interés en cepas veterinarias nosocomiales resistentes (Schwarz *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2010). Jackson en 2009, describe a *E. faecium* y *E. faecalis* como las especies más frecuentemente aisladas de perros y gatos, situación encontrada también en el presente trabajo donde el 80% (28/35) corresponde a *E. faecium* (Ver Anexo, Cuadro 3). Los enterococos han sido detectados en numerosos hábitat que incluyen el tracto intestinal de mamíferos, suelo, agua, plantas, insectos y alimentos. Son considerados líderes de las infecciones nosocomiales en humanos y son resistentes a agentes antimicrobianos comúnmente usados en hospitales. Además de ser reconocidos como una de las primeras causas de infecciones nosocomiales, también son considerados un reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos (Jackson *et al.*, 2009).

Resultados de otras investigaciones indican que perros y gatos sanos son fuente de enterococos resistentes a los antimicrobianos y pueden actuar como un reservorio de genes resistencia y se pueden transferir de las mascotas a las personas, de las personas a las mascotas y al medio ambiente. En este estudio se pueden corroborar las conclusiones de esas investigaciones, ya que los aislados bacterianos de este estudio fueron obtenidos a partir de muestras ambientales de hospitales veterinarios, en que los aislados tienen una alta probabilidad de provenir y haber sido diseminados por perros y gatos que ingresaron al recinto hospitalario (Delgado *et al.*, 2007).

Si bien *S.intermedius* corresponde una bacteria comensal, es la principal causa de pioderma en caninos y es un patógeno común de encontrar en otitis (Lloyd, 2007). *S.intermedius* parece ser común en el personal veterinario en constante contacto con los perros y los dueños de los perros con dermatitis atópica. El hecho de que *S.intermedius* es normalmente raro en los seres humanos sugiere la transmisión de perros a humanos. Cepas encontradas en humanos en general se correlacionan con cepas recuperadas de sus perros y esas cepas pueden ser resistentes a gran variedad de agentes antimicrobianos, incluyendo penicilinas, ácido fusídico, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas y cloranfenicol. Dado que la resistencia antimicrobiana en cepas de *S.intermedius* es común, existe el riesgo de que los genes de resistencia sean transferidos desde *S.intermedius* a estafilococos patógenos humanos (Tanner *et al.*, 2000; Guardabassi *et al.*, 2004). Cabe hacer notar que en esta memoria se aislaron dos cepas de *S.intermedius*.

La resistencia a tetraciclinas en cocos Gram-positivos es mediada por la expresión de genes *tet*, que codifican para determinantes de resistencia los cuales actúan mediante sistemas de bombas de eflujo y proteínas de protección ribosomal (Woodford, 2005).

En esta memoria de título, el gen de resistencia a tetraciclinas en bacterias Gram positivas con mayor frecuencia de detección fue *tet(M)*. Estos resultados se conciben con investigaciones previas, los cuales han descrito los determinantes de resistencia de mayor frecuencia según el

aislado bacteriano, para estafilococos y enterococos se encuentran proteínas de eflujo activo Tet(K), Tet(L) y proteínas de protección ribosomal Tet(M) y Tet(O) (Woodford, 2005).

Resultados de esta Memoria de título señalan que 10/35 (29%) de las cepas presentaron a lo menos un gen *tet* y poseen sensibilidad intermedia y/o sensibilidad a tetraciclinas y/o doxiciclinas. La presencia de alguno de los genes *tet* detectados en este estudio, no implica que ese aislado deba manifestar resistencia a tetraciclinas, ya que puede existir la presencia de uno de los genes, pero que este no se encuentre expresado. Por ésto, se debe considerar que el desarrollo de resistencia es dependiente del modo y el nivel de expresión del gen responsable, determinado por las condiciones ambientales en las cuales se encuentra la determinada cepa bacteriana. Por otro lado, en esta memoria en el 10/32 (31%) de las cepas resistentes a tetraciclinas y/o doxiciclinas no se detectaron los genes *tet* incluidos en el estudio. La ausencia de los genes *tet* incluidos en el estudio, no implica que ese aislado deba manifestar sensibilidad a tetraciclina, ya que su sensibilidad intermedia o resistencia frente al antimicrobiano puede estar dada por la presencia de otro gen *tet* no detectados en esta memoria. Ésto sobre la base de que los mecanismos de resistencia son muy numerosos y las bacterias pueden utilizar uno, varios combinados o todos.

Todo lo anteriormente expuesto reafirma que las técnicas de amplificación de genes, cada vez más usadas en el diagnóstico en microbiología, deben ser siempre complementadas con la susceptibilidad antibiótica de las bacterias aisladas, mediante el método de Kirby-Bauer que indica el patrón de resistencia o sensibilidad *in vitro* de un organismo ante un panel de antimicrobianos (Woodford y Sundsfjord, 2005). Así, de las cepas resistentes fenotípicamente a tetraciclinas y/o doxiciclinas, incorporadas en este trabajo, 12/35 (34%) no presentaron ninguno de los tres genes *tet* en estudio. Esto se puede explicar porque, si bien, los tres genes *tet* estudiados son los más frecuentes, no son los únicos responsables de la resistencia a estos antimicrobianos (Robert, 2010).

Otros resultados de investigaciones previas que han estudiado los mecanismos de resistencia antimicrobiana en enterococos aislados de animales de compañía, han evidenciado la frecuencia de los determinantes genéticos de la resistencia a tetraciclinas, siendo el gen *tet(M)* el más frecuente de encontrar seguido de *tet(O)* (Jackson *et al.*, 2010). En esta memoria el gen *tet(M)* fue identificado en 13/33 (39%) y *tet(O)* fue detectado en 12/33 (36%) de los aislados de enterococos.

Las bases genéticas de la resistencia antimicrobiana en *S.intermedius* han sido extensamente estudiadas entre bacterias de pequeños animales. Pequeños plásmidos median la resistencia a tetraciclinas vía *tet(K)*. La gran mayoría de las cepas de *S.intermedius* parecen preferir genes de resistencia transmitidos por transposones, como los genes de resistencia a tetraciclinas *tet(M)* el cual está localizado en transposones conjugativos Tn916. En este estudio en las dos

cepas aisladas se detectó el gen *tet(M)* lo que se condice con las investigaciones previas (Guardabassi *et al.*, 2004).

Llama la atención que *S.intermedius* resistente a tetraciclinas contiene genes de resistencia prevalentes en enterococos resistentes y estreptococos (por ej. *tet(M)*), sugiriendo que *S.intermedius* podría preferentemente adquirir esos genes de resistencia desde enterococos. La transferencia interespecie de genes de resistencia de aminoglicósidos transmitidos por plásmidos, se ha demostrado que se produce desde *E. faecalis* a *S. intermedius* bajo condiciones de laboratorio. Estos estudios indican que cepas de *S.intermedius* son capaces de adquirir genes de resistencia desde los enterococos. Es interesante que el hallazgo de investigaciones, puedan extrapolarse en esta memoria, al encontrar que las cepas de *S.intermedius* aisladas en esta memoria fueron obtenidas de las mismas áreas de muestreo en donde también fueron aislados *E. faecium* y ambos aislados presentaron genes *tet(M)* (Guardabassi *et al.*, 2004). (Ver anexo, Cuadro 5).

En este estudio el gen *tet(M)* fue identificado en 15/35 (42%) de los aislados. El gen *tet(M)* se encuentra frecuentemente asociado a transposones conjugativos Tn916 y Tn1545, lo que permite explicar su ubicuidad tanto en éste como en otros estudios de resistencia (Chopra y Roberts, 2001; Hegstad *et al.*, 2010)

La manifestación de la multiresistencia bacteriana corresponde a la expresión del material genético de las mismas. En este estudio, en 17/35 (48%) de los aislados se evidenció multiresistencia y presencia de genes de resistencia a tetraciclinas, lo cual es esperable al considerar que estos genes se encuentran frecuentemente asociados a plásmidos o transposones conjugativos, los que portan más de un gen de resistencia a antimicrobianos (Hegstad *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos sugieren que la PCR convencional, es una técnica que presenta grandes ventajas en la identificación de los genes en estudio. Es un método rápido, ya que el proceso de obtención de ADN, amplificación del mismo y electroforesis puede ser llevado a cabo dentro de 24 horas. La sensibilidad del método es alta, porque permite detectar bajas concentraciones del ADN que se desea amplificar y tiene una especificidad elevada, determinada especialmente por la secuencia de los partidores utilizados y por las condiciones de la hebra blanco de ADN. Adicionalmente, los resultados obtenidos en esta Memoria de Título se están complementando con la secuenciación de los amplicones resultantes con la finalidad de obtener controles positivos nativos (Wolcott, 1992; Powledge, 2004).

VII. CONCLUSIONES

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

VIII. ANEXOS

CUADRO 4: Número de muestras y su composición (%).

	N°	%
Total de muestras recolectadas	380	100
Cepas sometidas a estudio	120	32
Cepas nosocomiales	89	74.16
Cepas nosocomiales Gram +	56	62.9
Cepas nosocomiales Gram (+) con R o SI a tetraciclinas	35	39.3

CUADRO 5: Distribución de aislados nosocomiales Gram positivos, según especie.

 AISLADO	 n
<i>E. faecium</i>	28
<i>E. durans</i>	4
<i>E. faecalis</i>	1
<i>S.intermedius</i>	2
Total	35

CUADRO 6: Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de los 35 aislados bacterianos nosocomiales Gram positivos con R o SI a tetraciclinas.

Nº	Aislado	Especie	Enr	A	Amc	Cip	T	Stx	Van	D	G	Ox	Sul
1	051.	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
2	076.	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
3	082.	<i>E. faecium</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
4	055.	<i>E. faecium</i>	R	R	-	R	R	R	S	R	R	R	R
5	083.	<i>E. faecium</i>	R	R	-	R	R	R	S	R	R	R	R
6	061.	<i>E. faecium</i>	R	R	SI	R	R	R	S	R	S	R	R
7	087.	<i>E. faecium</i>	R	R	-	R	R	R	S	R	R	R	-
8	062 s	<i>E. faecium</i>	R	R	-	R	R	R	S	R	R	R	-
9	511 s	<i>E. faecium</i>	R	SI	-	R	R	R	S	R	R	R	-
10	054.	<i>E. faecium</i>	R	R	-	R	R	R	S	R	S	R	-
11	033-3	<i>E. faecium</i>	R	R	R	SI	SI	S	R	R	R	R	SI
12	341.	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	S	R	R	S	SI	S	R	R
13	356 M	<i>E. faecium</i>	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R
14	036 – 1	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	SI	R	S	S	R	S	R	R
15	001-3	<i>E. faecium</i>	R	R	SI	SI	R	S	S	R	S	R	R
16	085.	<i>E. faecium</i>	SI	S	-	R	R	R	S	R	R	R	-
17	358 s	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	SI	S	R	SI	SI	S	R	R
18	034.	<i>E. faecium</i>	SI	R	R	SI	R	S	S	SI	S	R	R
19	508-2	<i>E. faecium</i>	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	SI
20	508 M	<i>E. faecium</i>	R	S	-	SI	R	R	S	R	S	R	-
21	060.	<i>E. faecium</i>	R	SI	-	R	S	S	S	R	S	R	-
22	538 s	<i>E. faecium</i>	SI	S	S	SI	R	S	S	R	S	R	R
23	317.	<i>E. faecium</i>	S	R	SI	SI	SI	R	S	S	S	R	R
24	038 – 2	<i>E. faecium</i>	SI	S	S	SI	R	S	S	R	S	R	SI
25	001.	<i>E. faecium</i>	R	S	S	S	R	S	S	SI	S	R	SI
26	003-2	<i>E. faecium</i>	SI	SI	-	SI	R	S	S	R	S	SI	-
27	014 – 1	<i>E. faecium</i>	S	S	S	SI	R	S	S	SI	S	R	SI
28	551 – 1	<i>E. faecium</i>	S	S	-	SI	SI	S	S	SI	R	R	-
29	520	<i>E. durans</i>	R	R	-	R	R	R	R	S	S	R	-
30	031.	<i>E. durans</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	SI
31	548 s	<i>E. durans</i>	S	S	-	S	R	S	S	R	S	SI	S
32	028-1	<i>E. durans</i>	S	S	-	S	R	S	S	S	S	S	S
33	045-1	<i>E. faecalis</i>	R	S	-	R	SI	R	S	R	R	R	-
34	038.	<i>S. intermedius</i>	S	R	SI	S	R	R	S	R	S	R	SI
35	078 s	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	R	S	S	SI	S	S	S

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

CUADRO 7: Descripción del hospital veterinario, sector y lugar de donde fueron obtenidas las muestras de los 35 aislados bacterianos nosocomiales Gram positivos.

Nº	Nº	AISLADO	ESPECIE	HOSPITAL	SECTOR	LUGAR	GENES <i>tet</i>
1	2	551 - 1	<i>E. faecium</i>	Sta. Rosa	Hospital no	Jaula	(O)
2	7	511 s	<i>E. faecium</i>	Sta. Rosa	Hospital no	Mesón	
3	5	508 M	<i>E. faecium</i>	Sta. Rosa	Hospital infeccioso	Mesón	
4	5	508-2	<i>E. faecium</i>	Sta. Rosa	Hospital infeccioso	Mesón	(M),(O)
5	4	538 s	<i>E. faecium</i>	Sta. Rosa	Hospital infeccioso	Mesón	(M),(O)
6	2	548 s	<i>E. durans</i>	Sta. Rosa	Cirugía - Pabellón	Mueble	
7	7	520	<i>E. durans</i>	Sta. Rosa	Clínica – Consulta 1	Mesón	(O)
8	9	076.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital infeccioso	Jaula	(M)
9	7	054.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital infeccioso	Jaula	
10	2	003-2	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital infeccioso	Mueble	
11	1	028-1	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital infeccioso	Mueble	(M)
12	9	055.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital infeccioso	Mesón	
13	3	001.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital infeccioso	Mesón	(M)
14	6	001-3	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital infeccioso	Mesón	(M),(O)
15	9	083.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital infeccioso	Mesón	(K),(M),(O)
16	9	051.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital no	Jaula	(M)
17	7	033-3	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Hospital no	Mueble	(M),(O)
18	3	031.	<i>E. durans</i>	Bilbao	Hospital no	Jaula	(M),(O)
19	1	078 s	<i>S.intermedius</i>	Bilbao	Hospital no	Jaula	(M)
20	9	082.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Cirugía	Mesón	(O)
21	8	061.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Cirugía	Mesón	(M)
22	8	062 s	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Cirugía	Mueble	(M)
23	6	085.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Cirugía	Maquina	
24	6	045-1	<i>E. faecalis</i>	Bilbao	Ravos	Mesón	
25	8	087.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Rayos	Maquina	
26	4	060	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala de gatos	Jaula	
27	5	038.	<i>S.intermedius</i>	Bilbao	Sala común	Jaula	(M)
28	6	036 - 1	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala común	Jaula	(K),(M),(O)
29	5	034.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala común	Jaula	(M),(O)
30	3	038 - 2	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala común	Jaula	
31	2	014 - 1	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala común	Jaula	(O)
32	4	317.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala común	Jaula	(M)
33	6	356 M	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala común	Jaula	
34	5	358 s	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala común	Jaula	
35	6	341.	<i>E. faecium</i>	Bilbao	Sala común	Mesón	(M)

NºR: Número de antimicrobianos que resultó ser resistente para cada aislado.

IX. BIBLIOGRAFIA

ABRIL, C.; BRODARD, I.; PERRETEN, V. 2010. Two novel antibiotic resistance genes, *tet(44)* and *ant(6)-Ib*, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:3052-3055.

AGERSO, Y.; SANDVANG, D. 2005. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *alcaligenes*, *arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Appl Environ Microbiol.* 71:7941-7947.

AGWUH, K. N.; MACGOWAN, A. 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. *J Antimicrob Chemother.* 58:256-265.

AMINOV, R. I.; CHEE-SANFORD, J. C.; GARRIGUES, N.; MEHBOOB, A.; MACKIE, R. I. 2004. Detection of tetracycline resistance genes by PCR methods. *Methods Mol Biol.* 268:3-13.

AVENDAÑO, R. P. 2010. Identificación y estudio de sensibilidad antimicrobiana de bacterias nosocomiales aisladas en recintos hospitalarios veterinarias de la Universidad de Chile. Memoria de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. 54p.

BENNET, P. M. 2008. D: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology.* 153:S347-S357.

BRODERSEN, D. E.; CLEMONS, W. M.; JR.; CARTER, A. P.; MORGAN-WARREN, R. J.; WIMBERLY, B. T.; RAMAKRISHNAN, V. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell.* 103:1143-1154.

CALVO, J.; MARTÍNEZ, M. L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 27:44-52.

CANO, M.; DOMÍNGUEZ, M.; EZPELETAC, C.; PADILLAD, B.; RAMÍREZ DE ARELLANOE, E.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. 2008. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26: 220-229.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65: 232-260.

CONNELL, S. R.; TRACZ, D. M.; NIERHAUS, K. H.; TAYLOR, D. E. 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3675-3681.

CONNELL, S. R.; TRIEBER, C. A.; DINOS, G. P.; EINFELDT, E.; TAYLOR, D. E.; NIERHAUS, K. H. 2003. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO J.* 22:945-953.

DAVIES, J.; DAVIES, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol rev.* 74:417-433.

DELGADO, M.; NETO, I.; CORREIA, J.; POMBA, C. 2007. Antimicrobial resistance and evaluation of susceptibility testing among pathogenic enterococci isolated from dogs and cats. *Int J Antimicrob.* 30:98-100.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot.* 62:5-16.

DUGGAR, B. M. 1948. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. . *Ann N Y Acad Sci.* 51:177-81.

GASCHEN, F. 2008. Nosocomial infection, prevention and approach. En: 33° World Small Animal Veterinary Congress. Agosto 20 – 24 de 2008. Dublin, Irland. 3 pág.

GONZÁLEZ, R. G.; MELLA, M. S.; ZEMEMAN, Z. R.; BELLO, Y. H.; DOMINGUEZ, Y. M. 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Méd Chile.* 132:619-626.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, M.; JACOBSON, A. 2004. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet Microbiol.* 98:23-27.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 54:321-332.

GUERIN, E.; CAMBRAY, G.; DA RE, S.; MAZEL, D.; PLOY, M. C. 2010. The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons. *Med Sci.* 1:28-30.

GUERIN, E.; CAMBRAY, G.; SANCHEZ-ALBEROLA, N.; CAMPOY, S.; ERILL, I.; DA RE, S.; GONZALEZ-ZORN, B.; BARBÉ, J.; PLOY, M. C.; MAZEL, D. 2009. The SOS response controls integron recombination. *Science.* 22:1034.

HACKER, J.; KAPER, J. B. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* 54:641–679.

HEGSTAD, K.; MIKALSEN, T.; COQUE, T.; WERNER, G.; SUNDSFJORD, A. 2010. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.* 16:541-554.

JACKSON, C.; FEDORKA-CRAY, P.; DAVIS, J.; BARRETT, J.; BROUSSE, J.; GUSTAFSON, J.; KUCHER, M. 2010. Mechanisms of antimicrobial resistance and genetic relatedness among enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J Appl Microbiol.* 108:2171-2179.

JACKSON, C.; FEDORKA-CRAY, P.; DAVIS, J.; BARRETT, J.; FRYE, J. 2009. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *Appl Microbiol.* 107:1269-1278.

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

JOHNSON, J. 2002. Nosocomial infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 32: 1101-1126.

LIU, B.; POP, M. 2009. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res.* 37:D443–D447.

LLOYD, D. 2007. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clin Infect Dis.* 45(Suppl 2): 148-152.

MAHAMOUD, A.; CHEVALIER, J.; ALIBERT-FRANCO, S.; KERN, W. V.; PAGÈS, J. M. 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrob Chemother.* 59:1223-9.

MELLA, S.; MUÑOZ, Q. 2009. Tigeciclina: Aspectos estructurales, farmacocinéticos y farmacodinámicos. *Rev Chil Infect.* 26(Supl 1):10-12.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J. 2004. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Vet Med – Czech.* 49:79–100.

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

NIKAIDO, H.; THANASSI, D. G. 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1393–1399.

NORMAN, A.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci.* 364:2275–2289.

OEHLER, R.; POLACEK, N.; STEINER, G.; BARTA, A. 1997. Interaction of tetracycline with RNA: photoincorporation into ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 25: 1219–1224

OGEER-GYLES, J. S.; MATHEWS, K.A.; BOERLIN, P. 2006. Nosocomial infections and antimicrobial resistance in critical care medicine. *J Vet Emerg Crit Care.*16: 1-18.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 2003. Prevención de las infecciones nosocomiales, GUIA PRACTICA. [en línea] <http://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12.pdf> [consulta: 02-03-2011]

PAULSEN, T. I. 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Current Opinion in Microbiology.* 6:446–451.

PIOLETTI, M.; SCHLÜNZEN, F.; HARMS, J.; ZARIVACH, R.; GLÜHMANN, M.; AVILA, H.; BASHAN, A.; BARTELS, H.; AUERBACH, T.; JACOBI, C.; HARTSCH, T.; YONATH, A.; FRANCESCHI, F. 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine an IF3. *EMBO J.* 20:1829-1839.

POOLE, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med.* 39:162.

POWLEDGE T. 2004. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ.* 28:44-50.

RASMUSSEN, B. A.; GLUZMAN, Y.; TALLY, F. P. 1994. Inhibition of protein synthesis occurring on tetracycline-resistant, TetM-protected ribosomes by a novel class of tetracyclines, the glycylyclines. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:1658–1660.

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

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

ROBERTS, M.C. 2010. Tetracycline genes. [En línea] <<http://faculty.washington.edu/marilynr/>> [consulta: 20-04-2012].

RODRÍGUEZ, I. S.; BARRERA, H. S. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. Vol. VII, No. 3, Julio-Septiembre.

SCHWARZ, S.; ROBERTS, M.; WERCKENTHIN, C.; PANG, Y.; LANGE, C. 1998. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Vet Microbiol*. 63:217-227.

SMILLIE, C.; GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; FRANCIA, M. V.; ROCHA, E. P.; DE LA CRUZ, F. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*. 74:434-452.

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

TENOVER, C. F. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med*. 119: S3-S10.

TEUBER, M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*. 4:493-499.

TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70:296-316.

TRZCINSKI, K.; COOPER, B.; HRYNIEWICZ, V.; DOWSON, C. 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 45: 763-770.

UMBER, J.; BENDER, J. 2009. Pets and antimicrobial resistance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 39:279-292.

VICENTE, D.; PÉREZ-TRALLERO, E. 2010. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 28:122-130.

WOODFORD, N. 2005. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clin Microbiol Infect*. 11(Suppl 3):2-21.

WOODFORD, N.; SUNDSFJORD, A. 2005. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where?. *J. Antimicrob. Chemoter*. 56: 259-261

WOLCOTT, M. J. 1992. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin Microbiol Rev*. 5:370-386.

WRIGHT, G. D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* 5:175-186.

WRIGHT, G. D. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology.* 13:589–594.

ZAKERI, B.; WRIGHT, G. D. 2008. Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochem Cell Biol.* 86:124-136.