



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHAVEZ”**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y METALES EN
AISLADOS CLÍNICOS DE *ENTEROBACTERIAS*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**ÁREA TERMINAL:
BIOMEDICINA CELULAR Y MOLECULAR**

**PRESENTA
Q.F.B. ILIANA TAFOLLA MUÑOZ**

**DIRECTORA DE TESIS:
D. en C. Ma. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS**

Morelia, Michoacán, Agosto del 2009

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR MICROBIANA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ" DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORIA Y DIRECCIÓN DE LA D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS.

COMITÉ

D. en C. BERTHA FENTON NAVARRO

Ph. D. VIRGINIA A. ROBINSON FUENTES

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

CONTENIDO

INDICE GENERAL.....	II
INDICE DE ABREVIATURAS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	X

INDICE GENERAL

	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Flora comensal del intestino.....	1
I.2 Bacilos entéricos (<i>Enterobacteriaceae</i>).....	1
I.3 <i>Escherichia coli</i>	2
I.3.1 <i>Escherichia coli</i> como agente causal de infecciones.....	2
I.4 Enfermedades gastrointestinales vinculadas con <i>E. coli</i>	2
I.4.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxígena (ETEC).....	3
I.4.2 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	3
I.4.3 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	4
I.4.4 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	4
I.4.5 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	5
I.4.6 <i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa (ADEC).....	5
I.5 Identificación bacteriana.....	5
I.5.1 Identificación fenotípica bacteriana.....	5
I.5.2 Identificación genético molecular de bacterias.....	6
I.6 Resistencia a antibióticos.....	7
I.6.1. Resistencia de origen genético a los fármacos.....	9
a) Resistencia cromosómica.....	9
b) Resistencia extracromosómica.....	11

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

I.6.2 Resistencia a Tetraciclinas.....	19
I.6.3 Resistencia a Sulfonamidas.....	21
I.7 Resistencia a metales pesados.....	23
I.7.1 Resistencia a Cobre.....	25
I.8 Co selección de Resistencia.....	26
I.9 Antecedentes de los aislados bacterianos.....	27
II. JUSTIFICACIÓN.....	29
III. HIPOTESIS.....	30
IV. OBJETIVOS.....	30
IV.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
IV.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
VI.1 Material Biológico.....	32
VI.2 Técnicas de análisis genético – molecular.....	32
VI.2.1 Extracción de ADN total.....	32
VI.2.2 Amplificaciones del ADN por PCR.....	33
VI.2.3 Extracción y limpieza del producto de PCR.....	35
VI.2.4 Secuenciación de los productos de PCR purificados.....	35

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

VI.2.4.1 PCR de secuenciación.....	36
VI.2.4.2 Purificación del producto de PCR de secuenciación.....	36
VI.2.5 Análisis de secuencias.....	36
VII. RESULTADOS.....	37
VII.1 Ensayos de tipificación genético molecular.....	37
VII.2 Regiones genéticas asociadas con la resistencia a tetraciclinas y sulfonamidas.....	42
VII.3 Regiones genéticas asociadas con la resistencia a cobre.....	50
VII.4 Región genética asociada con la presencia de Integrones de clase 1.....	53
VIII. DISCUSIÓN.....	55
VIII.1 Tipificación genético molecular.....	55
VIII.2 Genes de patogenicidad en Enterobacterias.....	55
VIII.3 Resistencia a tetraciclinas.....	56
VIII.4 Resistencia a sulfonamidas.....	58
VIII.5 Resistencia a cobre.....	59
VIII.6 Presencia de Integrones de clase 1.....	60
VIII.7 Co-selección de resistencia a antibióticos y a metales.....	62

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

IX. RESUMEN DE LOS RESULTADOS.....	64
X. CONCLUSIONES.....	65
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica
°C	Grado Centígrado
G	Gramo
Kb	Kilobase
LBA	Agar Luria Bertani
LT	Toxina Termolábil
M	Molar
MDa	MegaDalton
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µL	Microlitro
NaCl	Cloruro de Sodio
Ng	Nanogramo
Nm	Nanomolar
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rpm	Revoluciones por Minuto
SDS	Sulfato Dodecil de Sodio
ST	Toxina Termoestable
Tris-HCl	Tris- Ácido clorhídrico

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
1 ADN total de lo aislados bacterianos.....	37
2 Detección de patotipos.....	38
3 Tipificación mediante PCR del gen 16S de RNAr.....	39
4 Dendograma del gen 16S RNAr.....	41
5 Detección de los genes <i>tet</i>	42
6 Dendograma del gen <i>tetA</i>	44
7 Dendograma del gen <i>tetB</i>	45
8 Detección del gen <i>sul1</i>	46
9 Dendograma del gen <i>sul1</i>	47
10 Detección del gen <i>sul2</i>	48
11 Dendograma del gel <i>sul2</i>	48
12 Detección del gen <i>sul3</i>	50
13 Detección del gen <i>copA</i>	51
14 Dendograma del gen <i>copA</i>	52
15 Presencia de Integrones de clase 1.....	53

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
I Variables en la expresión y transferencia de la resistencia bacteriana.....	15
II Mecanismos de resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos.....	18
III Mecanismos de resistencia para la caracterización de los genes <i>tet</i> y <i>otr</i>	20
IV Cepas bacterianas de referencia.....	32
V Iniciadores para la amplificación de genes presentes en <i>E. coli</i> diarreagénica.....	34
VI Iniciadores para la amplificación del gen 16S de RNA ribosomal.....	34
VII Iniciadores para la amplificación de regiones que codifican para la resistencia a antibióticos.....	34
VIII Iniciadores para la amplificación de regiones que codifican para la resistencia a metales.....	35
IX Iniciadores para la amplificación de regiones que codifican para Integrones.....	35
X Porcentajes de enterobacterias patotipificadas como ETEC.....	39
XI Porcentaje de Enterobacterias tipificadas mediante PCR y secuenciación del gen 16S de RNAr.....	40

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

XII	Porcentaje de genes <i>tet</i>	43
XIII	Porcentaje de genes <i>sul</i>	50
XIV	Porcentaje del gen <i>copA</i>	51
XV	Porcentaje de los integrones de clase 1.....	54

RESUMEN

En países en vías de desarrollo, principalmente los de América Latina, dentro de los cuales está México, las Enterobacterias son responsables de un alto nivel de morbilidad y mortalidad durante la edad pediátrica. *E. coli* es una bacteria de la microbiota normal del intestino de humanos y animales y es considerada un patógeno oportunista importante causante de infecciones gastrointestinales. Debido a esto es común encontrar niño infectados con estos patógenos bacterianos, estando ETEC a la cabeza de la lista.

El uso indiscriminado de antimicrobianos y la contaminación ambiental por metales pesados actúan como un mecanismo de selección para ambos fenotipos de resistencia, mediante la transferencia de elementos móviles, como plásmidos, transposones e integrones. Aislados patógenos y comensales de Enterobacterias de la Cd. de Morelia Michoacán mostraron diferentes fenotipos de multirresistencia a antibióticos y a metales, sin embargo no existe información acerca de los determinantes genéticos responsables de dicha resistencia para especies bacterianas de la localidad.

La amplificación y secuenciación del gen 16S de RNAr de 85 aislados clínicos de Enterobacterias mostró que 13 cepas fueron ETEC LT y 3 cepas fueron ETEC presentando las toxinas LT y ST; 5 *M. morgani*, de las cuales 2 presentan las toxinas LT y ST de ETEC y 64 aislados comensales de *Escherichia coli*. Los genes *tet* que median resistencia a tetraciclinas, se distribuyeron de la siguiente manera para ETEC, se encontró en el 31% *tetB* y el 43% presentó tanto *tetA* como *tetB*. En *M. morgani*, el 100% presentó *tetA* y *tetB*. En las cepas comensales de *E. coli* se encontró *tetA* en el 22%, *tetB* en el 29%; en tanto que los determinantes de resistencia a sulfonamidas (genes *sul*) se distribuyeron de la siguiente manera, para ETEC fue de 25% para el gen *sul1*; el 31% para el gen *sul1* y *sul2*. Por otra parte la presencia del gen *copA*, que media resistencia a cobre se observó en el 80% de ETEC, 60% en *E. coli* comensal y 80% en *M. morgani*. Los integrones son sistemas de captura de casetes de genes de resistencia a antibióticos y a metales, se obtuvieron en el 90% de ETEC, 52% *E. coli* comensal y 40% en *M. morgani*. Los resultados sugieren que las Enterobacterias tienen un papel importante en la emergencia y diseminación de la resistencia a antibióticos en Latinoamérica.

Los distintos patrones obtenidos con los determinantes genéticos responsables de la resistencia a tetraciclinas, sulfonamidas, cobre y la presencia de integrones en *E. coli* y *M. morgani* muestran además, variación significativa en las secuencias en la población de estudio de la Ciudad de Morelia.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Flora comensal del intestino

Los microorganismos que se encuentran presentes de manera continua en el cuerpo son comensales. Su enriquecimiento en una determinada región depende de factores fisiológicos, (temperatura, humedad) y de nutrientes e inhibidores (Hentges, 1993; Simon y col., 1982). Las bacterias entéricas se establecen en el intestino normal unos pocos días después del nacimiento y a partir de entonces constituyen la porción principal de la flora microbiana aerobia normal (anaerobios facultativos). Los miembros de la flora residente en el intestino sintetizan vitamina K y ayudan a la absorción de los nutrientes, además, evitan la colonización por patógenos y posibles enfermedades a través de la interferencia bacteriana, que puede implicar competencia por receptores o sitios de unión sobre las células huésped, competencia por nutrientes, inhibición mutua por productos metabólicos tóxicos, inhibición mutua por antibióticos o bacteriocinas u otros mecanismos (Koneman, 2003; Brook y col., 2003).

Entre las bacterias coliformes anaerobias, sólo unos serotipos persisten en el colon durante tiempo prolongado y la mayor parte de los serotipos de *E. coli* sólo se presentan unos cuantos días (Shooter, y col., 1977).

I.2 Bacilos entéricos (*Enterobacteriaceae*)

La Familia Enterobacteriaceae es un vasto grupo heterogéneo de bacilos Gram negativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales. Esta familia incluye géneros como, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, entre otros. Las enterobacterias son microorganismos aerobios, fermentan una amplia variedad de carbohidratos, poseen una estructura antigénica compleja y producen varias toxinas y otros factores de virulencia (Souza y col., 2001).

Algunos microorganismos entéricos, como *Escherichia coli*, forman parte de la flora normal e incidentalmente causan enfermedad.

I.3 *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, es el anaerobio facultativo predominante de la flora humana del colon. Este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal del infante en las primeras horas de vida, y usualmente permanece en el lumen intestinal de manera inocua, sin embargo, en un huésped inmunosuprimido o cuando atraviesan la barrera gastrointestinal, las cepas de *E. coli* no patógenas pueden causar infección. Además, los miembros sanos pueden ser susceptibles a infección por clones de *E. coli* que tengan la capacidad de causar un amplio espectro de enfermedades en el humano (Brook y col., 2003).

I.3.1 *Escherichia coli* como agente causal de infecciones

Por lo general, las bacterias entéricas no causan enfermedad e incluso pueden contribuir a la función normal de intestino y a la nutrición. Cuando se presenta infección de importancia clínica, habitualmente se debe a *E. coli*, pero las bacterias entéricas causan infecciones nosocomiales y en ocasiones en la comunidad. Las bacterias sólo se convierten en patógenas cuando alcanzan los tejidos fuera de los sitios normales en el intestino o en otros menos comunes. Muchos patógenos emergentes, entre los que se pueden encontrar variantes genéticas de cepas de *E. coli*, tienen gran importancia a nivel mundial en la salud pública y causan focos de infección que afectan a los humanos (Nataro y Kaper, 1998). Las infecciones debidas a *E. coli* patógena pueden limitarse a las superficies mucosas o diseminarse al cuerpo. Los síndromes clínicos generales resultado de la infección con cepas patógenas de *E. coli* pueden ser tres: (i) infecciones del tracto urinario, (ii) sepsis / meningitis y (iii) enfermedades diarreicas entéricas.

I.4 Enfermedades gastrointestinales vinculadas con *E. coli*

E. coli es causante de diarrea, principalmente en niños es muy común a nivel mundial, las diarreas que ocasiona *E. coli*, se clasifican por las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa la enfermedad por un mecanismo diferente (Rodríguez-Angeles, 2002). Las

propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes situados en plásmidos. De manera similar, con frecuencia las toxinas son mediadas por plásmidos o por fagos (Arias y Huget, 2002).

E. coli diarreagénica es la bacteria más frecuentemente aislada en pacientes con diarrea del viajero. Hasta la fecha se han descrito 6 patotipos de *E. coli* diarreagénicas, siendo los más relevantes como causa de diarrea del viajero la *E. coli* enterotóxigena (ETEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Rodríguez-Angeles, 2002; Arias y Huget, 2002).

1.4.1 *Escherichia coli* enterotoxígena (ETEC)

Es la causa más común de la “diarrea del viajero” y es el agente etiológico importante de diarrea en lactantes de los países en vías de desarrollo. Algunas cepas de ETEC producen una enterotoxina termolábil (LT) bajo control genético de un plásmido o producen una enterotoxina termoestable (ST) bajo control genético de un grupo heterogéneo de plásmidos y en transposones, ambas toxinas producen hipersecreción en el intestino delgado. Muchas cepas poseen ambas toxinas, causando diarrea más grave. Los plásmidos portadores de los genes para enterotoxinas (LT, ST) también pueden portar genes para factores de colonización que facilitan la adhesión de las cepas de *E. coli* al epitelio intestinal. Potencialmente cualquier *E. coli* puede adquirir un plásmido que codifique para enterotoxina (Rodríguez-Angeles, 2002; Arias y Huget, 2002; Coria-Lorenzo y col., 2001).

1.4.2 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

La enfermedad ocasionada por esta bacteria se presenta comúnmente en los niños de los países en vías de desarrollo y en las personas que viajan a dichos países. Todos los genes necesarios para la invasión son transportados en un plásmido de 140-MDa. IPA (invasive plasmid antigen) codifica *ipaB*, *ipaC*, *ipaD*, *ipaA* e *ipgC* (que es el acompañante del *ipaB* y el *ipaC*). Las proteínas efectoras son secretadas por el MXI-Spa tipo III, que también está codificado en el plásmido de 140-MDa. *ipaB*, *ipaC*, y *ipaD* desempeñan un papel esencial para la entrada de bacterias, mientras que *ipaA* es parcialmente implicada en la

invasión. El complejo *ipaB-ipaC* se inserta en las membranas celulares epiteliales, formando un poro que permite la translocación de proteínas efectoras, como *ipaA*. El proceso desencadena una serie de acontecimientos de transducción de señales en las células epiteliales (Rodríguez-Angeles, 2002; Torres y col., 2005; Cortez-Ortiz, y col., 2002;).

I.4.3 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

La EHEC produce una verotoxina, muy similar a la Shiga, así denominada por su efecto citotóxico sobre las células Vero, por lo que se le llamó “toxina Shiga” (SXT), la cual es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago SXT, que está insertado en el genoma. Con frecuencia se identifica al serotipo O157:H7 (Rodríguez-Angeles, 2002; Arias y Huget, 2002; Coria-Lorenzo y col., 2001).

I.4.4 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Causa común de diarrea en los neonatos de los países en desarrollo. De manera clásica produce diarrea epidémica en las guarderías y cuneros con grandes tasas de mortalidad; en la actualidad es menos común en los países desarrollados. La EPEC se adhiere a las células de la mucosa epitelial y da lugar a cambios en el citoesqueleto, puede invadir las células. Difiere de las otras *E. coli* con propiedades enteroadherentes o enteroagregantes que producen diarrea. La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman BFP (bundle-forming pilus) cuya información está codificada en un plásmido de 50-70MDa denominado EAF (EPEC adherence factor) y de algunos genes cromosomales (Rodríguez-Angeles, 2002; Arias y Huget, 2002; Coria-Lorenzo y col., 2001).

I.4.5 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Causa diarrea aguda y crónica en personas de los países en desarrollo. Se caracteriza por su patrón de adherencia a células humanas, debido a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/II), codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60MDa (Rodríguez-Angeles, 2002; Arias y Huget, 2002; Coria-Lorenzo y col., 2001).

I.4.6 *Escherichia coli* de adherencia difusa (ADEC)

Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido (Rodríguez-Angeles, 2002; Arias y Huget, 2002; Coria-Lorenzo y col., 2001). Tiene particular importancia reconocer que muchas bacterias entéricas son “oportunistas” que causan enfermedad cuando se introducen en pacientes con el sistema inmune suprimido. Otras enterobacterias como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* y *Citrobacter* son importantes patógenos nosocomiales.

I.5 Identificación bacteriana

I.5.1 Identificación fenotípica bacteriana

Las bacterias se pueden identificar por métodos tradicionales con base en sus características bioquímicas y serológicas. Los caracteres morfológicos han sido utilizados para identificar especies, familias y géneros; sin embargo, contrariamente a los marcadores genéticos moleculares, los marcadores morfológicos son fuertemente influenciados por el medio ambiente y por consecuencia se necesitan programas, nutrición y diseños experimentales especiales para distinguir la variación genotípica de la fenotípica (Wang y col., 1993).

Por otra parte, se han desarrollado tecnologías, como el sistema BIOLOG[®], que es considerado un equipo de punta en sistemas de diagnóstico e identificación de distintos microorganismos, mediante las características fenotípicas de las células bacterianas por medio de la tecnología denominada Microarreglo de Fenotipos (MFs) con capacidad de analizar el metabolismo del carbono, del nitrógeno, del fósforo y del azufre de una cepa microbiana, lo cual nos ayuda a describir la diversidad fisiológica (uso de sustratos), complementaria a la diversidad genética (O’Hara, 2005; Koneman, 2003; Tang y col., 1998; Kingler y col., 1992).

I.5.2 Identificación genético molecular de bacterias

Los ribosomas son críticos para la función celular e interaccionan con un gran número de moléculas diferentes, incluyendo el RNA mensajero (RNAm) y el RNA de transferencia (RNAt), las secuencias de las moléculas de RNAr están altamente conservadas y se han conservado notablemente a través de la evolución (Janda y Abbott, 2007; Rodicio y Mendoza, 2004; Herrera, 1999). El RNAr es la mejor molécula blanco para estudiar las relaciones filogenéticas debido a que se encuentra presente en todos los microorganismos, es funcionalmente constante y se compone de dominios tanto altamente conservados como variables (Stackerbrandt y Goebel, 1994).

La comparación de la secuencia del gen 16S de RNAr, ha facilitado la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables y la elucidación de sus relaciones naturales (Pace, 1996). Las secuencias nucleotídicas constantes del gen 16S presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los cebadores y así aplicar de forma más fácil la técnica de secuenciación (Naum y col., 2008; Dams y col., 1988). Estudios usando el gen 16S de RNAr para determinar filogenias microbianas, se ha posicionado como el gen ideal, que en asociación con otros genes del metabolismo basal “Housekeeping”, pueden servir de referencia para la identificación de genes de transferencia horizontal, genes de virulencia (Naum y col., 2008).

La secuenciación del RNAr se ha aplicado en identificación bacteriana, mediante el análisis de las secuencias parciales del 16S RNAr es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos (Naum y col., 2008; Lane y col., 1985).

I. 6 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos es la capacidad que tiene un organismo para soportar los efectos de los antibióticos ante los cuales es normalmente sensible. Los genes de resistencia se obtienen probablemente de los microorganismos productores de antibióticos, a través de un proceso de intercambio genético. Con el fin de defenderse de los antibióticos que ellos producen, estos organismos han desarrollado mecanismos para neutralizar o destruir sus propios antibióticos. La existencia de estos genes significa que, bajo las condiciones adecuadas, es posible transferir esta resistencia a otros organismos (Brook y col., 2003; Sayah y col., 2005).

El problema de la resistencia a los antibióticos es global y complejo e incluye un gran número de especies bacterianas de importancia médica y es de difícil control por su multicausalidad (Sayah y col., 2005). El consumo masivo de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente favorable a la selección de bacterias que soportan los efectos tóxicos de los antimicrobianos. Entre los factores que han contribuido al aumento de la resistencia a los antibióticos están la concentración de la población en centros urbanos, el control inadecuado de las infecciones en los hospitales a los pacientes seriamente enfermos, la migración masiva a través de las regiones del planeta y el uso inadecuado de los antibióticos (Benavides-Placencia y col., 2005). Los antibióticos difieren de los otros medicamentos porque no sólo ejercen un efecto terapéutico sino que alteran también la ecología de la microflora del cuerpo y del medio externo. La gran capacidad adaptativa de las bacterias es el resultado del efecto combinado de rápidos índices de crecimiento, de mutaciones genéticas y de la selección de las mismas, así como de su habilidad para intercambiar material genético horizontalmente. Estudios con base en diseños epidemiológicos tradicionales demostraron distintos grados de asociación entre la resistencia a un antibiótico particular y sus niveles de

consumo. Sin embargo, el fenómeno de la resistencia a los antibióticos es complejo y requiere de análisis y metodologías innovadoras.

Las bacterias Gram negativas poseen una membrana plasmática interna y una membrana plasmática celular externa, entre las cuales hay una capa delgada de peptidoglucano. La permeabilidad de las membranas a los antibióticos y el transporte de las moléculas a través de las barreras son de gran importancia en el caso de las bacterias Gram negativas, las cuales poseen dos membranas que obstaculizan a los agentes antimicrobianos que tienen como blanco de acción el interior de la célula (Koneman, 2003)

El gran número de especies dentro de la familia de las Enterobacterias conlleva una gran variabilidad de patrones de sensibilidad natural. Esta diversidad se ve además incrementada por la posibilidad de adquirir genes de resistencia, tanto de microorganismos de la misma especie como de una especie distinta. La adquisición de multiresistencia puede llevar a la ineficacia de la mayoría de los antibióticos utilizados en la práctica clínica (Navarro-Risueño y col., 2002; Bruinsma y col., 2003).

Si bien normalmente son comensales en la naturaleza, ciertas cepas de *E. coli* son asociadas con una variedad de infecciones en humanos y animales (Yang y col., 2004). Las bacterias que presentan resistencia antimicrobiana no son frecuentemente aisladas de la flora comensal intestinal. Además, la resistencia en tales bacterias comensales no es un problema, pero la posible transferencia de elementos de resistencia para patógenos zoonóticos en el intestino tiene serias implicaciones para la salud pública (Hoyle y col., 2005; Bruinsma y col., 2003). La relación entre el mantenimiento de la resistencia en una población y el uso de agentes selectivos es compleja, y otros factores juegan un rol en la adquisición o persistencia de microorganismos con resistencia a antibióticos. La transmisión de resistencia entre bacterias comensales del intestino puede ocurrir por transferencia horizontal, a través del movimiento de elementos genéticos móviles o de forma vertical a través de la proliferación y subsiguiente diseminación de cepas bacterianas resistentes (Hoyle y col., 2005).

I.6.1 Resistencia de origen genético a los fármacos.

La mayor parte de los microorganismos resistentes a los antibióticos surge como el resultado de cambios genéticos y de los procesos subsecuentes de selección por los antibióticos.

a) Resistencia cromosómica

Se desarrolla como resultado de una mutación espontánea en un *locus* que controla la susceptibilidad a un antibiótico determinado. La presencia del antibiótico sirve como mecanismo de selección al suprimir los microorganismos susceptibles y favorecer el crecimiento de los mutantes resistentes al antibiótico. La mutación espontánea ocurre con una frecuencia de 10^{-12} a 10^{-7} y por tanto es causa poco frecuente del surgimiento de la resistencia clínica a los antibióticos. Comúnmente, los mutantes cromosómicos son más resistentes en virtud de los cambios en un receptor estructural para el antibiótico. Así, la proteína p12 sobre la unidad 30S del ribosoma bacteriano sirve como receptor para la adhesión de las estreptomicinas. La mutación en el gen que controla dicha proteína estructural produce resistencia a la estreptomicina. Una estrecha región del cromosoma bacteriano contiene genes estructurales que codifican algunos receptores para antibióticos, incluso los de la eritromicina y los aminoglucósidos. La mutación también puede producir la pérdida de la PBP (proteínas de unión a penicilinas), y conferir a estos mutantes resistencia contra los antibióticos β -lactámicos.

Los genes de resistencia a antibióticos son localizados en plásmidos y transposones, con la capacidad de transferencia entre una variedad de especies bacterianas. En años recientes, un tercer mecanismo de diseminación de genes de resistencia se ha descubierto. Este es un elemento de DNA que media la integración de genes de resistencia por un mecanismo de recombinación sitio específico. Este elemento de DNA, se le ha denominado integrón, y se encuentran además como parte de transposones de la familia Tn21 o independientemente en diversos grupos de plásmidos (Lévesque y col., 1995).

La diseminación de genes de resistencia a antibióticos por transferencia horizontal tiene rápida emergencia entre aislados clínicos de bacterias. La

propagación de genes de resistencia aumenta cuando estos forman parte de casetes de genes móviles, mediante transferencia horizontal por varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen i) movilización de casetes individuales por medio de integrones que codifican integrasas, ii) movimiento cuando el integrón contiene el casete localizado en un nuevo lugar, probablemente por transposición, iii) diseminación de grandes transposones como Tn21 que lleva integrones, y iv) movimiento de plásmidos conjugativos que contienen integrones entre diferentes especies bacterianas (White y col., 2001; Yu y col., 2003).

Se han encontrado genes de resistencia a antibióticos en aislados clínicos de bacterias Gram negativas, que forman parte de casetes de genes insertados dentro de un integrón. Los casetes contienen genes que confieren resistencia a un espectro de antibióticos, incluyendo aminoglucósidos, β -lactámicos, cloranfenicol y trimetoprim, así como genes que confieren resistencia a antisépticos y desinfectantes. Los casetes de genes consisten en un gen flanqueado por un sitio de recombinación, conocido como elemento base 59 (59-be), el cual es reconocido por el integrón que codifica para la recombinasa sitio específico (*intl*) (Chang y col., 2000). Los casetes de genes móviles pueden existir en la célula como una molécula discreta circular libre, aunque la forma circular no replique o exprese el gen asociado (Rosser y Young, 1999). De manera alternativa, el integrón codifica una enzima recombinasa sitio específica (*intl*) que media la inserción del casete dentro del integrón al sitio de recombinación *attI* (White y col., 2001; White y col., 2000). Además existen pocos reportes que sugieren que los integrones son propagados entre aislados bacterianos de animales y humanos (Zhang y col., 2004).

La acumulación de genes de resistencia en integrones es una explicación para la emergencia de cepas multirresistentes de *Enterobacteriaceae* (Lévesque y col., 1995; Leverstein-van Hall y col., 2002; Yu y col., 2003).

b) Resistencia extracromosómica

Las bacterias casi siempre contienen elementos genéticos extracromosómicos denominados plásmidos. Los factores R son un tipo de plásmidos portadores de genes para resistencia a uno y casi siempre, a varios antibióticos y metales pesados. Los plásmidos son flexibles y evolucionan rápidamente ante la presión selectiva. Los genes de plásmidos de resistencia antimicrobiana con frecuencia controlan la síntesis de enzimas capaces de destruir dichos fármacos. Por tanto, los plásmidos generan resistencia a las penicilinas y a las cefalosporinas gracias a los genes que poseen para la síntesis de β -lactamasas. Los plásmidos codifican enzimas que destruyen al cloramfenicol (acetiltransferasa); enzimas que acetilan, adenilan o fosforilan varios aminoglucósidos; enzimas que determinan el transporte activo de las tetraciclinas a través de la membrana celular, entre otras (Correa-Basurto y col., 2007). El material genético y los plásmidos pueden transferirse mediante los mecanismos de Transducción, Transformación, Transposición y Conjugación. Este último es el método más común para propagar la resistencia a múltiples fármacos entre diferentes géneros de bacterias Gram negativas.

En las bacterias entéricas Gram negativas casi toda la resistencia a los fármacos se atribuye a la extensa transmisión de plásmidos de resistencia entre los diferentes géneros (Correa-Basurto y col., 2007). La práctica de incorporar fármacos en los alimentos para animales de granja tiene como objetivo hacerlos crecer con mayor rapidez, pero se acompaña de un incremento de los microorganismos entéricos resistentes a los fármacos en la flora fecal de las personas que trabajan en dichas granjas. Un aumento concomitante de las infecciones causadas por *Salmonella* resistente a antibióticos en Inglaterra condujo a restringir los suplementos de antibióticos en los alimentos para animales (Brook y col., 2003).

Todas las formas de resistencia se transmiten a través de los genes de la bacteria a su progenie. Además, los genes que producen resistencia también pueden transmitirse de unas bacterias a otras a través de plásmidos, que son fragmentos cromosómicos que contienen sólo una pequeña cantidad de genes (entre éstos, el gen de la resistencia). Así, algunas bacterias se unen a otras de

la misma especie de forma transitoria, transmitiéndose los plásmidos. Si una bacteria recibe dos plásmidos portadores de genes de resistencia a diferentes antibióticos, estos genes se pueden unir en un único plásmido. La resistencia combinada puede así ser transmitida a una nueva bacteria, en la que puede unirse a otra forma de resistencia. Se generan así plásmidos que son portadores de resistencia a diferentes clases de antibióticos. Existen además plásmidos que pueden ser transmitidos entre especies diferentes de bacterias, permitiendo la transferencia de resistencias a múltiples antibióticos entre especies bacterianas muy dispares (Koneman, 2003).

Muchos plásmidos llevan genes que median su transferencia de un organismo a otro, así como otros genes vinculados con la adquisición o el reacomodo del DNA, por consiguiente, genes con orígenes evolutivos independientes pueden asimilarse por plásmidos que están muy diseminados entre la población bacteriana. Una consecuencia de estos eventos genéticos se ha observado en la rápida diseminación, entre la población bacteriana, de la resistencia a los antibióticos transmitida por plásmidos, después del uso indiscriminado de aquéllos en los hospitales (Koneman, 2003; Brook y col., 2003; Sayah y col., 2005). Los transposones son elementos genéticos que contienen varios kpb de ADN, incluida la información necesaria para su migración de un locus genético a otro (Koneman, 2003). Los transposones simples, secuencias de inserción, llevan sólo esta información genética. Los transposones complejos, portan genes para funciones especializadas como la resistencia a antibióticos y están flanqueados por secuencias de inserción. A diferencia de los plásmidos, los transposones no contienen información genética necesaria para su propia replicación. Muchos plásmidos se transfieren con facilidad entre las células bacterianas de una especie a otra, o, incluso, de un género a otro y la inserción de un transposon en uno de tales plásmidos puede causar su diseminación en la población (Tabla I). El DNA del plásmido se moviliza con facilidad de una cepa a otra, de una especie a otra, de un género a otro, o incluso, a través de una barrera importante entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Koneman, 2003).

Los integrones se descubrieron a principios de la década de los años 80's. Se caracterizan por captar genes que codifican determinantes de

resistencia a antibióticos, a metales pesados y desinfectantes. Se encuentran ampliamente diseminados entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas (*V. cholerae* y *P. aeruginosa*) (Sabaté y Prats., 2002; White y col., 2001; Rowe-Magnus y col. 1999; Rosser y Young, 1999).

Los genes que se incorporan a los integrones presentan una estructura particular y se han denominado genes casete. La integración se produce por un mecanismo de integración sitio específico. Hasta la actualidad se han descrito más de 60 casetes de genes de resistencia en bacterias Gram negativas.

Los integrones en su forma más sencilla, están formados por tres elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (casetes). Uno que codifica para una integrasa (*intl*), el otro es el lugar de recombinación sitio específico (*attI*) y por último, un promotor (P_{ant}) para la expresión de los genes de casetes integrados. A veces contienen un segundo promotor más fuerte, P_2 , localizado adyacentemente a 3' del primero. El lugar de recombinación sitio específico *attI* está formado por 65 pares de bases, incluyendo dos regiones correspondientes a los lugares de unión fuerte y débil de la integrasa y un lugar de recombinación, en el cual los genes capturados son integrados gracias a la acción de la integrasa. Esta integrasa de aproximadamente 1kb, pertenece a la familia de las recombinasas. En total un integrón simple con estos únicos elementos y sin genes casetes incorporados posee un tamaño aproximado de 1.1kb.

La clasificación de los integrones se basa en la secuencia de la integrasa. Actualmente se conocen nueve clases. Los miembros de la clase 1, 2 y 3 contienen genes casete de resistencia a los antibióticos (Rechia y col., 1999; Arakawa y col., 1995) los de las clases 4, 5, 6 y 7 contienen genes que no codifican resistencia a antibióticos (Clark y col., 2000; Nield y col., 2001), el de clase 8 no presenta ningún gen casete (Nield y col., 2001) y el integrón de clase 9 contiene un gen casete de resistencia a antibióticos y otros casetes de genes de funciones desconocidas (McIver y col., 2002). Los integrones de clase 1 son los que se encuentran con mayor frecuencia en cepas aisladas de casos clínicos, se caracterizan por tener la secuencia conservada 5' (5'CS) que contiene el gen codificante de la integrasa y la mayoría de ellos contiene además una secuencia conservada 3' (3'CS) que

contiene un gen que confiere resistencia a componentes de amonio cuaternario (*qacEΔ1*) y un gen de resistencia a sulfonamida (*su11*); estos dos genes de resistencia no son casetes sino que se encuentran fijos en este segmento conservado 3'CS del integrón. Muchos de los integrones pertenecientes a esta clase se han localizado en elementos transponibles.

Los integrones son estructuras sedentarias que funcionan como sistemas de captura de genes que confieren ventajas selectivas y que raramente captan genes indispensables para las bacterias. Poseen una gran versatilidad por tener la habilidad de reconocer una amplia variedad de secuencias de recombinación, así como una capacidad prácticamente ilimitada de intercambio y reserva de casetes. Esta flexibilidad le permite a la bacteria una rápida adaptación al flujo impredecible de los nichos ecológicos. (Sabaté y col., 2002).

Brotos de enfermedades entéricas ocasionados por comida o aguas contaminadas por especies de *Salmonella* y *Shigella* se deben a la presencia de cepas que contienen elementos genéticos en los que se encuentra determinada la resistencia múltiple a drogas (plásmidos R), las cuales han sido reportadas en muchas partes del mundo (Shaw y Cabelli, 1980; Hoyle y col., 2005). Los coliformes R⁺ son la fuente de los plásmidos R, este dato es conocido desde 1959, cuando científicos en Japón aislaron la primera cepa R⁺ de *Shigella*, durante un brote de disentería y recuperaron *E. coli* con el mismo patrón de resistencia de los individuos. Esto mostró que el intercambio de plásmidos R puede ocurrir entre especies de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* (Shaw y Cabelli, 1980).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

Tabla I. Variables en la expresión y transferencia de la resistencia bacteriana

Característica	Variable	Comentarios
Localización	Cromosómica	Estabilidad genética; expresión a menudo constitutiva
	Extracromosómica	Plásmidos fácilmente movilizados para la transferencia de una célula bacteriana a otra
	Transposón	Puede transferir material genético entre el cromosoma y el plásmido o entre células bacterianas
Transferencia	Conjugación	Tanto plásmidos (factor R) como transposones
	Transducción	Transferencia por bacteriófagos
	Transformación	Transferencia directa de DNA entre especies compatibles
Expresión	Constitutiva	Producida con exposición al estímulo o sin ella
	Inducible	Producida sólo después de la exposición al estímulo
	Constitutiva-inducible	Producida a bajo nivel sin el estímulo; producción enormemente aumentada después de la estimulación

Se ha demostrado que cerca del 60% de los aislados de coliformes con resistencia múltiple a drogas pueden transferir sus plásmidos a cepas de laboratorio de *E. coli*, *Shigella* o *Salmonella*. Sin embargo, en muchos de estos estudios, la frecuencia actual de transferencia no se ha determinado, ni la capacidad de las cepas fecales y ambientales de *E. coli* y patógenos entéricos para recibir los plásmidos. Estos factores son importantes en la evaluación del riesgo (Shaw y Cabelli, 1980; Sayah y col., 2005).

Algunas de las cepas que transfieren solo parte de sus determinantes de resistencia poseen plásmidos no transferibles los cuales codifican para marcadores de resistencia no transferible. Un indicador de la existencia de dos plásmidos R compatibles en la misma cepa ambiental se observó con la cruce de una muestra fecal, donde la explicación es que el plásmido que codifica para la resistencia a ampicilina, también codifica para la resistencia a estreptomicina (Shaw y Cabelli, 1980).

La probabilidad de que una de cinco bacterias de *E. coli* ingeridas por nadadores en aguas contaminadas pueden donar su resistencia a la flora fecal es mínima, especialmente debido a que las cepas fecales son generalmente receptores pobres. La probabilidad de que un plásmido R de la ingestión de *E. coli* R⁺ se podría transferir a *E. coli* residente o una subsiguiente ingestión de patógenos entéricos podría incrementar la colonización intestinal por *E. coli* R⁺.

La transferencia de plásmidos entre cepas de *E. coli* puede ocurrir en el intestino, aún en ausencia de antibióticos (Shaw y Cabelli, 1980).

Las enzimas son transportadas por plásmidos que con frecuencia median la resistencia a otros antibióticos (aminoglucósidos, tetraciclinas y sulfonamidas), de tal forma que la aparición de patrones no habituales de resistencia también puede ser un indicio de la presencia de enzimas de amplio espectro (Koneman, 2003).

Los microorganismos poseen muchos mecanismos diferentes para desarrollar la resistencia a los antibióticos (Tabla II) (Sayah y col., 2005; Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 1998). Uno de estos es la producción de enzimas que destruyen al antibiótico activo, de esta forma los bacilos Gram negativos producen otras β -lactamasas diferentes a la producida por los estafilococos, son en su mayor parte enzimas inducibles de clase A que se forman en el nivel de la membrana celular, resistentes a la penicilina G. Las β -lactamasas de las bacterias Gram negativas son más complicadas. La mayoría de las Enterobacterias contiene enzimas cromosómicas constitutivas que se producen a bajo nivel y que varían según la especie. La inducción de altos niveles de estas enzimas genera resistencia y expande la cobertura eficaz de las enzimas a otras resistentes a la acción de los betalactámicos, como las cefalosporinas de tercera generación y los carbapenémicos (Koneman, 2003). Las bacterias Gram negativas poseen suficientes estrategias como para producir β -lactamasas que inactivan antibióticos en forma específica, como el imipenem, que son resistentes a la acción de la mayor parte de las enzimas. Las bacterias Gram negativas resistentes a los aminoglucósidos (en virtud de un plásmido) producen enzimas adenilantes, fosforilantes, acetilantes que destruyen al antibiótico, además presentan resistencia al cloramfenicol si producen una cloramfenicol acetiltransferasa. Otra estrategia de resistencia es el cambio de la permeabilidad al antibiótico (Sánchez y col., 1998). La resistencia a la amikacina y otros aminoglucósidos, especialmente en las bacterias Gram negativas, a veces depende de la ausencia de permeabilidad a estos antibióticos, aparentemente por un cambio en la membrana interna que reduce el transporte activo al interior de la célula. Los sistemas de bombeo que con mayor frecuencia se caracterizan en bacterias Gram negativas están

acoplados al potencial de membrana y compuestos por tres unidades proteicas, una transportadora (integrada en la membrana citoplasmática), una porina (situada en la membrana externa) y una tercera proteína que actúa como nexo de unión entre las dos anteriores, y de aquí deriva el de *Multi-Drug-Resistance* (MDR) *systems*. Un mecanismo adicional de resistencia consiste en alterar estructuralmente el “blanco” del antibiótico, donde la resistencia a algunas penicilinas y cefalosporinas puede ser función de la pérdida o alteración de la PBP (proteínas de unión a penicilinas). Las alteraciones en los sitios de acción ribosómico de los macrólidos y lincosaminas, como la eritromicina y la clindamicina, son estrategias de resistencia para este grupo de antibióticos. Un mecanismo importante de resistencia tanto al trimetoprim como al sulfametoxazol es la alteración de las enzimas blanco de la vía bioquímica de formación de ácidos nucleicos, la dihidropteroato sintetasa para las sulfonamidas y la dihidrofolato reductasa para el trimetoprim. También se puede desarrollar una vía metabólica diferente, que pasa por alto la reacción inhibida por el antibiótico, de esta manera algunas bacterias resistentes a la sulfonamida no requieren del PABA extracelular y, al igual que las células de mamífero, pueden utilizar ácido fólico preformado. Por último algunas bacterias desarrollan una enzima diferente que todavía puede ejecutar su función metabólica pero es mucho menos afectada por el antibiótico, en bacterias resistentes al trimetoprim, la ácido dihidrofólico reductasa se inhibe con mucha menor eficiencia que en bacterias susceptibles al trimetoprim.

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

Tabla II. Mecanismos de resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos

Mecanismo	Grupo antibiótico	Ejemplos
Inactivación Enzimática	Betalactámicos	β -lactamasas: penicilinasas, cefalosporinas, carbapenemasas
	Aminoglucósidos	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos de bacterias Gram negativas y Gram positivas
Receptores Alterados	Betalactámicos	Proteínas fijadoras de penicilina alteradas en bacterias Gram negativas y Gram positivas
	Alteraciones ribosómicas	Tetraciclinas, eritromicina, aminoglucósidos
	Alteraciones de la DNA girasa	Quinolonas
	Enzimas bacterianas alteradas	Sulfametoxazol, trimetoprim
Transporte alterado del antibiótico	Alteraciones en las proteínas de la membrana externa (porinas)	Bacterias Gram negativas; flujo hacia el interior disminuido
	Fuerza motora protónica disminuida	Aminoglucósidos y bacterias Gram negativas; flujo hacia el interior disminuido
	Transporte activo desde la célula bacteriana	Tetraciclinas; eritromicina, flujo hacia el exterior activo

Los antibióticos son efectivos para el control de infecciones por *E. coli*, aunque en la actualidad muchos son inefectivos para bacterias que adquieren resistencia a estos compuestos. La resistencia en microorganismos patógenos como *E. coli* para dos o más clases de antibióticos es ahora común tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. La susceptibilidad a antibióticos puede recuperarse al discontinuar el uso de los antibióticos, la resistencia bacteriana a antibióticos puede persistir mucho tiempo después de la eliminación de la presión selectiva (Saénz y col., 2004).

En México, en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes pediátricos durante 1960 a 1980, la resistencia hacia la amikacina, se ha observado en 91% de los casos, así como a gentamicina en 82%. Para la ampicilina se incrementó de 35 a 80%; para la tetraciclina, se mantuvo en más de 90%; para el cloranfenicol aumentó de 57 a 68% y para el trimetoprim-sulfametoxazol de 52 a 72% (Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 1998; Benavides-Placencia y col., 2005; Cabrera y col., 2004; Yang y col., 2004). Para amoxicilina-ácido clavulánico el porcentaje de resistencia reportado es del 27% (Informe anual regional de los países participantes en la red del monitoreo/ vigilancia de la resistencia a los

antibióticos; Moraga y col., 2003) y los porcentajes más bajos documentados son para ceftriaxona con 22%, cefotaxima 19%, pefloxacina 11% y netilmicina 4% (Correa-Basurto y col., 2007; Sayah y col., 2005).

I.6.2 Resistencia a Tetraciclinas

Las tetraciclinas continúan utilizándose para el tratamiento en humanos y veterinaria de muchas enfermedades causadas tanto por bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como a *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma* spp. y *Chlamydia* spp., (Adelowo y Fagade, 2009; Henriques y col., 2008; Karami y col., 2006; Roberts, 2005). La eficacia de las tetraciclinas ha ido disminuyendo debido a la amplia existencia de genes de resistencia, a menudo asociados con elementos genéticos móviles.

Los determinantes genéticos implicados en la resistencia a tetraciclinas son los genes *tet* y *otr* (Kazimierzak y col., 2006; Pérez-Trallero e Iglesias, 2003; Atencio Bracho y col., 2003; Yamaguchi, 1997).

Se han descrito 38 genes *tet* y *otr* responsables de la resistencia a tetraciclina, asociados a plásmidos, transposones simples o conjugativos e integrones, que pueden presentar otros genes de resistencia a otros antibióticos y/o a metales pesados y transferirse así a otras bacterias comensales o patógenas (Bennett, 2008; Roberts, 1997; Yamaguchi, 1997).

Incluye 23 genes que codifican para proteínas de eflujo, 11 genes que codifican para proteínas de protección ribosomal y 3 genes que codifican para una enzima inactivante y un gen del cual se desconoce su mecanismo de resistencia (Tabla III).

Tabla III. Mecanismos de resistencia para la caracterización de los genes tet y otr.

Genes de eflujo		Genes ribosomales		Gen	
				enzimático	Desconocido
Gram negativa	Gram positiva	Gram negativa	Gram positiva	Gram negativa	Gram Positiva
<i>tetA</i> , B, C, D, E		<i>tetM</i>	<i>tetM</i>	<i>tetX</i>	<i>tetU</i>
<i>tetG</i> , H, I ^a , J		<i>Teto</i>	<i>tetO</i>		<i>otrC</i> ^a
<i>tetK</i> (raro)	<i>tetK</i>		<i>tetS</i>		
<i>tetL</i> (raro)	<i>tetL</i>		<i>tetT</i>		
	<i>tetP</i> ^b	<i>tetQ</i>	<i>tetQ</i>		
<i>TetY</i>		<i>tetW</i>			
<i>Tet30</i> , <i>tet31</i>			<i>otrA</i>		
	<i>tetV</i>				
	<i>tetZ</i>				
	<i>otrA</i>				

Las proteínas de eflujo son las más estudiadas, los genes que codifican para estas proteínas pertenecen a la superfamilia de facilitación mayor (MFS) (Yamaguchi, 1997). Estas proteínas estas divididas en 6 grupos según la identidad de la secuencia de aminoácidos.

Grupo 1: son encontrados comúnmente en bacterias Gram negativas *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetG*, *tetH*, *tetZ* y probablemente *tetI*, *tetJ* y *tet30* los cuales están asociados frecuentemente con plásmidos conjugativos (Henriques y col., 2008; Yamaguchi, 1997; Roberts, 1997). De este grupo se han encontrado en Grampositivos 4 genes, ejemplo de este es el *tetZ*.

Grupo 2: incluye *tetK* y *tetL* y *tetZ*, se encuentran mayoritariamente en Gram positivos encontrados en pequeños plásmidos móviles o en el cromosoma.

Grupo 3: incluye *otrB* y *tet*, encontradas en *Streptomyces sp.* Son similares topológicamente al grupo 2 (Roberts, 2005; Yamaguchi 1997).

Grupo 4: *tetAP* de *Clostridium sp.* El gen *tetP* es bastante inusual porque consiste en un gen que codifica una bomba de expulsión funcional *tetAP*, unida a un gen que codifica una proteína de protección de ribosoma,

tetBP; *tetAP* se ha encontrado solo, pero *tetBP* siempre se ha encontrado unida al gen *tetAP* (Roberts y col., 2005).

Grupo 5: incluye *tetV* de *Mycobacterium smegmatis*.

Grupo 6: incluye determinantes aún sin nombre en concreto, de *Corynebacterium striatum* y también incluye una proteína que se cree utiliza ATP en lugar de un gradiente de protones como fuente de energía.

La protección del ribosoma se debe a la presencia en las bacterias de genes *tet* que codifican la síntesis de unas proteínas citoplasmáticas cuya función es proteger el ribosoma frente a la acción de estos antimicrobianos. Actualmente se conocen 11 genes que codifican para las proteínas de protección ribosomal, los cuales están generalmente asociados con transposones conjugativos en el cromosoma (Roberts, 1997), presentes en su mayoría en bacterias Gram positivas, ejemplos de estos son: *tetM*, *tetO*, *tetP*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tetW*, *otrA* (Kazimierzak y col., 2008; Kazimierzak y col., 2006; Roberts, 2005). Para el mecanismo de resistencia de desactivación enzimática, solo se ha observado en anaerobios estrictos, *Bacteriodes* y se conocen 3 genes, *tetX*, *tet34* y *tet37*, los cuales no tienen importancia clínica (Roberts, 2005).

A diferencia de las bombas de expulsión, confieren resistencia a tetraciclina, minociclina y doxiciclina, por tanto confieren un mayor espectro de resistencia que las bombas de expulsión específicas para estos antimicrobianos. En este grupo se han descrito 9 proteínas: *tetM*, *tetO*, *tetP*, *tetQ*, *tetS*, *tetT*, *tetW*, *otrA* y otra que aún no se le ha asignado un nombre específico (Dang y col., 2008).

I.6.3 Resistencia a Sulfonamidas

Primeras drogas eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de las infecciones bacterianas en el ser humano. Son antimicrobianos sintéticos, bacteriostáticos, de amplio espectro, inicialmente con actividad frente a una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos aunque su uso cada vez es más limitado en humanos. Se les caracteriza por compartir una estructura química similar al ácido para-amino-benzoico (PABA), compitiendo con él por la enzima dihidropteroato sintetasa que interviene en el

metabolismo del ácido fólico (Bean y col., 2009; Pérez-Trallero y col. 2003; Roberts, 2002).

Las sulfonamidas son efectivas para el control de infecciones por *E. coli*, aunque en la actualidad muchas son ineficaces para cepas que adquieren resistencia a estos compuestos.

La resistencia a sulfonamidas es un fenómeno creciente y generalizado, y cuando se presenta afecta a todos los componentes del grupo, en *E. coli* se conocen tres tipos de genes de resistencia a sulfonamidas: *sul1*, *sul2* y *sul3* (Martínez, 2007). El gen *sul1* está ampliamente distribuido en *E. coli* a consecuencia de su localización en integrones de clase 1, en cepas de casos clínicos con resistencia a múltiples antibióticos (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003; Hammerum y col., 2006). El gen *sul2* se detecta a menudo junto con los genes *strA* y *strB* de resistencia a estreptomycin, además se ha observado un incremento en la diseminación del gen *sul2* entre aislados clínicos de *E. coli* que del gen *sul1* en Europa. Por último el gen *sul3*, recientemente descubierto en un plásmido conjugativo de 54 kb encontrado en aislados de *E. coli* de cerdos en Suiza (Bean y col., 2009; Perreten y Boerling, 2003), ahora es descrito en aislados clínicos de humanos (Grape y col., 2003).

También se han descrito al menos dos genes en plásmidos o integrones (*sul2* y *sul3*) codificadores de enzimas que implican modificaciones de la sintasa y disminución de la permeabilidad (Hammerum y col., 2006).

Las técnicas de epidemiología molecular resultan de gran utilidad para la detección, el seguimiento y el control de los brotes infecciosos (Tang y col., 1998), pudiendo identificar en cada caso el elemento de diseminación, ya sea la propagación de un mismo clon, o la transmisión de elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones. Por último, la correcta información y preparación del personal médico sanitario, así como el uso racional de los antibióticos son también factores cruciales que contribuyen a evitar que este importante problema epidemiológico, aún potencial, se convierta en una alarma real (Macía y col., 2005).

1.7 Resistencia a metales pesados

Algunos cationes de metales (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+}) son nutrientes trazas esenciales para la vida celular y funciones en las reacciones enzimáticas. Los metales pesados (Ag^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+}) son cationes no esenciales y tóxicos. Las sales y compuestos de metales son usados además como agentes antimicrobianos en medicina y como biocidas en hospitales y otros campos humanos (Gupta y col., 2001).

La presencia de metales pesados en el medio ambiente ejerce una fuerte presión selectiva sobre los organismos que allí habitan (Moraga y col., 2003). Un incremento en su concentración puede ejercer una presión selectiva capaz de modificar la flora microbiana, las bacterias son inhibidas, la diversidad de la comunidad es severamente reducida y solo una limitada y extremadamente resistente fracción sobrevive (Smets y col., 2003). Si la descarga del contaminante es de carácter permanente, como sucede habitualmente con los metales pesados, se produce una selección de aquellos genotipos que pueden sobrellevar dicho estrés (Silver y Ji, 1992). La relación metal pesado-microorganismo origina una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el metal (Mondaca y col., 1993).

A bajas concentraciones de metal (aproximadamente 1 a 10 mM), la actividad microbiana es temporalmente deteriorada, pero la adquisición y la expresión de genes de resistencia a metales pesados puede ocurrir, y el principal evento en las dinámicas de la comunidad bacteriana puede propagarse a genes de resistencia a metales, que frecuentemente codifican para plásmidos o transposones, y como resultado la intrínseca resistencia a metales pesados (Smets y col., 2003).

Se ha propuesto que una contribución significativa de la adaptación a corto plazo de las comunidades microbianas es por transferencia horizontal, o lateral, intercambio de información genética entre sus miembros. La alta incidencia de plásmidos, los cuales son una forma dominante de transmisión horizontal de ADN, en cepas bacterianas aisladas de sitios contaminados, sugiere la importancia de transferencia horizontal de genes en ambientes contaminados. Además, se ha demostrado la incidencia de la transferencia

horizontal de genes en comunidades microbianas de la subsuperficie que han sido históricamente expuestas a concentraciones subtóxicas de metales pesados. Examinar el flujo de genes en comunidades microbianas naturales es experimentalmente difícil, muchos estudios han demostrado la transferencia horizontal de genes en una variedad de comunidades microbianas de aguas dulces y suelos; sin embargo, no es claro como la velocidad y extensión de la transferencia horizontal de genes puede ser afectada por el grado de estrés ambiental, como la presencia de metales pesados (Smets y col., 2003).

Se ha demostrado la existencia de sistemas MDR inducibles por metales pesados en enterobacterias del medio ambiente (Sánchez y col., 1998). Esto da idea de que los sistemas de bombeo son ubicuos y, de hecho, el análisis de secuencias completas de microorganismos indica su presencia en los cromosomas de diversas bacterias. Además, se cree que los sistemas MDR no han surgido como un mecanismo de defensa frente al uso, más o menos indiscriminado, de antibióticos y posiblemente están implicados en la resistencia a tóxicos presentes de modo habitual en el medio ambiente. Estos tóxicos pueden ser compuestos producidos por las plantas o por microorganismos del suelo, y de esta manera la adquisición de multiresistencia.

Los reportes indican alta resistencia a Pb y As (100%), 77% Cu y 36% a Ni en bacterias Gram negativas no fermentadoras, principalmente *Pseudomonas* y *Alcaligenes* (Moraga y col., 2003), además se ha observado resistencia a dos o más metales pesados, por ejemplo, Plomo-Arsénico-Cobre en bacterias Gram negativas. La presencia de bacterias entéricas en sitios de excesivo uso de antibióticos y presencia de metales pesados, posibilita la ocurrencia de un intercambio génico en la comunidad bacteriana presente, mediante la transferencia horizontal de determinantes de resistencia, por ejemplo, plásmidos. Esto puede explicar parcialmente la relación de resistencia conjunta hacia metales pesados y antibióticos detectadas en las bacterias (Moraga y col., 2003).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a metales pesados para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005; Cervantes y col., 2006). Entre ellos se encuentran

principalmente los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad; b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes y col., 2006).

Se han descrito tres tipos de sistemas de expulsión de cationes (Nies, 2003), entre los cuales se encuentran los sistemas que expulsan iones derivados de cadmio, cobalto, cobre, níquel, plata, plomo y zinc: i) los facilitadores de difusión de cationes (CDF), proteínas que se encuentran distribuidas en los tres dominios de la vida (Bacteria, Archae y Eukarya); ii) las ATPasas de tipo P que constituyen una superfamilia de transportadores de metales que son energizadas por la hidrólisis del ATP (Solioz y col., 1994) y iii) proteínas involucradas en la expulsión de metales, este grupo está formado por los transportadores de la familia RND, denominadas así porque sus miembros participan en procesos de resistencia, nodulación y división celular en diferentes especies bacterianas (Saier, 2003; Cervantes y col., 2006).

Los sistemas de expulsión de aniones, están formados por los transportadores que expulsan a los oxianiones derivados del arsénico y de cromo e incluyen tanto a sistemas quimiosmóticos como los relacionados con ATPasas. El metaloide arsénico puede formar dos tipos de oxianiones: arsenito (AsO_2^- , la forma más tóxica) y arsenato (AsO_4^{3-}). El sistema de expulsión del oxianión tóxico cromato (CrO_4^{2-}), es una proteína que expulsa el cromato del citoplasma en un proceso quimiosmótico dependiente de la cadena respiratoria (Pimentel y col., 2002; Cervantes y col., 2006).

I.7.1 Resistencia a Cobre

Altas concentraciones de cobre intracelular son tóxicas tanto para células Eucariotas y Procariotas (Rosen, 2002; Rensing y col., 1999; Peña y col., 1999). El cobre (Cu) es un potente bactericida que actúa dañando las membranas y proteínas de las bacterias (Cooksey y col., 1990). *E. coli* está equipada con un sistema múltiple que mantiene los niveles de cobre aún en condiciones ambientales variantes, este sistema es un homólogo de ATP7b de humanos, *copA* que presenta 31% de identidad proteica (Espíritu Santo y col.,

2008). *copA* es una ATPasa tipo-P de translocación de Cu(I), componente central en la homeostasis del cobre, bombea el exceso de cobre fuera del citosol hacia el periplasma. Una vez en el periplasma, el cobre es sujeto a otros dos sistemas *cueO* y *cusCFBA*, las cuales asisten a *copA* en el control intracelular de los niveles de cobre (Noyce y col., 2006; Rensing y Grass, 2003). *CueO* es una multicobre oxidasa que convierte Cu (I) a Cu (II), la forma menos toxica. El sistema *cusCFBA* es una bomba de difusión del catión, transportado por una bomba a través de la membrana externa para expulsarla de la célula (Yamamoto e Ishihama, 2005). *cusF* es una proteína periplasmática de unión para Cu (I) y Ag (I) que puede expulsarlos por el sistema *cusCBA* (Espiritu Santo y col., 2008; Macomber y col., 2007; Silver y Phung, 1996).

I.8 Co selección de Resistencia

La persistencia y proliferación de resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos representa un considerable problema de salud pública. Los metales derivados de fuentes antropogénicas representa la principal fuente de contaminación en el medio ambiente. La contaminación por metales en los ambientes naturales importantes podría tener un papel en el mantenimiento y la proliferación de la resistencia a los antibióticos (Baker-Austin y col., 2006).

Teniendo en cuenta que niveles antropogénicos de metales pesados se encuentran varios órdenes de magnitud superior a los niveles de antibióticos. A diferencia de los antibióticos, los metales no están sujetos a la degradación y posteriormente pueden representar a largo plazo la presión selectiva.

La asociación entre los tipos y niveles de contaminación por metales y los patrones específicos de la resistencia a antibióticos, sugieren que hay varios mecanismos que son la base de este proceso de co-selección, e incluyen la co-resistencia y la resistencia cruzada.

La co-resistencia, se da por diversos determinantes de la resistencia presentes en el mismo elemento genético. Existen distintos reportes de la co-resistencia de antibióticos o metales en aislados clínicos y ambientales y para comunidades o poblaciones bacterianas.

La resistencia cruzada se da en el mismo determinante genético responsable de resistencia a los antibióticos y a los metales.

En ese sentido se ha observado una relación entre el hábitat de procedencia y las características fisiológicas de las cepas bacterianas, como se ha reportado para aislados ambientales de bacterias enteropatógenas y enterotoxigénicas, que mostraron alta sensibilidad a plata, cobre y plomo debido al ambiente salino de las costas de donde se colectaron (Chaudhury y Kumar, 1996). Además, la resistencia múltiple a antibióticos así como su asociación con la resistencia a metales (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) se ha reportado en hábitat terrestres y acuáticos donde se han aislado bacterias (Lazar y col., 2002).

Es importante señalar que en este trabajo se consideran antibióticos utilizados en el estudio de características fenotípicas de multirresistencia, que nos permita evaluar la magnitud y extensión de los marcadores de resistencia circulantes, observándose tanto en *E. coli* no diarreagénica, así como en los patógenos entéricos.

I.9 Antecedentes de los aislados bacterianos

Estudios realizados con aislados bacterianos obtenidos de heces de pacientes con diarrea, mostraron que dichas cepas tipificadas por métodos microbiológicos convencionales como *E. coli* daban amplificación con los iniciadores dirigidos hacia las toxinas LT y ST de ETEC (Carreras-Villaseñor, 2004). Sin embargo, la tipificación por BIOLOG (Rosales-Castillo, 2004) de dichos aislados dio como resultado que el 71% se comportaron como *E. coli*, el 22% como *Morganella morganii ss morganii* y el 7% restante como *Salmonella sp I (choleraesuis) ST paratyphi A*. Por lo que, solo la secuenciación del gen 16S de rRNA permitirá saber si fueron las condiciones en que se llevaron a cabo los ensayos los que hicieron que estas cepas se comportaran metabólicamente de forma diferente a *E. coli* o en realidad se trata de otras especies que están presentando los genes de patogenicidad específicos de *E. coli*. Estos aislados mostraron multirresistencia a antibióticos y niveles de resistencia distintos para cada cepa (Rosales-Castillo, 2007).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

De acuerdo con estudios realizados con aislados de *E. coli* provenientes de pacientes no diarreicos con problemas gastrointestinales y diagnósticos clínicos variados, Mojica-Hernández (2006) observó resistencia múltiple a antibióticos en el 95% de los aislados estudiados así como altos niveles de resistencia a plomo (40 mM). El 100% de los aislados fue resistente a plata 0.100 mM pero sensibles a 0.250 mM y con respecto a cobre, el 10% de los aislados fueron resistentes a una concentración de 2.8 mM. Este orden de resistencia se observó en un estudio con aislados clínicos de *E. coli* enterotóxigenica (Guzmán-Martínez, 2007), aunque se observó mayor sensibilidad a cobre y menos sensibilidad a plata y plomo por parte de las cepas de *E. coli* enterotóxigenica.

II. JUSTIFICACIÓN

Las tetraciclinas y las sulfonamidas se utilizan para el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas, y las sales de cobre se utilizan como agentes antimicrobianos en medicina y como biocidas en hospitales, por otra parte, la resistencia a iones metálicos, y en muchos casos también los determinantes genéticos para la resistencia a antibióticos está frecuentemente asociada a elementos móviles (plásmidos, integrones), resulta interesante detectar dichas regiones genéticas en aislados clínicos de Morelia, Michoacán, ya que no existe tal información para especies bacterianas de la localidad aunque se sabe que presentan resistencia a ambos agentes químicos.

Esta información puede proporcionar un conocimiento más amplio sobre los mecanismos de transferencia de resistencia en Enterobacterias asociadas a problemas de salud pública, con lo cual se pueden sentar las bases para una comprensión epidemiológica más amplia, que permita establecer estrategias de tratamiento, control y prevención de enfermedades diarreicas en la ciudad de Morelia y eventualmente en el estado de Michoacán.

III. HIPOTESIS

La tipificación genético molecular de los aislados clínicos coincide con la tipificación metabólica, además, existe variación significativa en los determinantes genéticos responsables de la resistencia a antibióticos y a metales en aislados clínicos de Enterobacterias de la población de estudio de la ciudad de Morelia.

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL

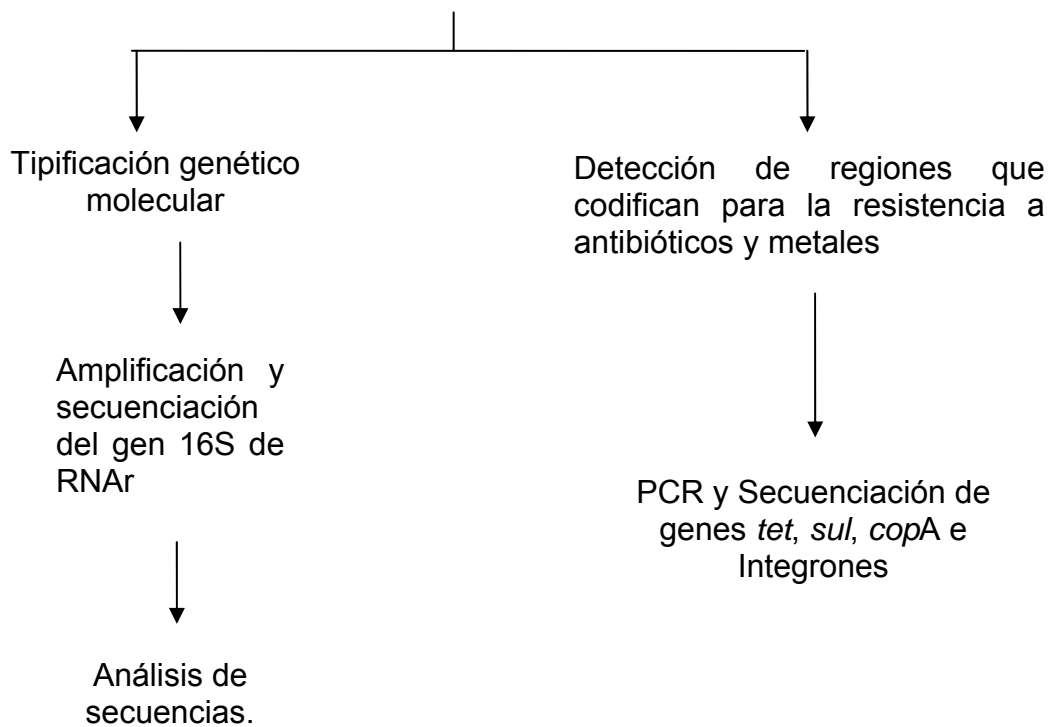
Realizar un estudio genético-molecular que permita identificar a los aislados de Enterobacterias y los determinantes genéticos asociados a la resistencia a antibióticos y a metales pesados en aislados clínicos de Enterobacterias.

IV.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ Realizar una tipificación genético molecular a los aislados bacterianos y construir un árbol de relaciones taxonómicas
- ✚ Identificar regiones genéticas asociadas con la resistencia a sulfonamidas y tetraciclina
- ✚ Identificar las regiones genéticas asociadas a la resistencia a Cu
- ✚ Detectar la presencia de integrones responsables de la resistencia a antibióticos y a metales y conocer la variabilidad de estas regiones entre las cepas de estudio

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Cepas de Enterobacterias tipificadas previamente por BIOLOG y
amplificación del gen 16S de RNAr con iniciadores específicos
para Enterobacterias



VI. MATERIAL Y METODOS

VI.1 Material Biológico

Se estudiaron 85 aislados clínicos de Enterobacterias provenientes de heces de pacientes que acudieron al IMSS y el Hospital Infantil de la Ciudad de Morelia, Mich., y al Hospital Civil “Dr. Miguel Silva”, tipificados previamente mediante técnicas microbiológicas convencionales, por Biolog y por amplificación del gen 16S de RNAr con iniciadores específicos para Enterobacterias. Se utilizaron como control las cepas de referencia de *Escherichia coli* que se muestran en la tabla IV, adquiridas en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE).

TABLA IV. Cepas bacterianas de referencia

CEPA	NOMBRE	CLAVE
ETEC-LT	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica con toxina termolabil	H10407
ETEC-ST	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica con toxina termoestable	25611
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	E11
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	O111
EC TOP 10	<i>Escherichia coli</i> no patógena (comensal)	

VI.2 Técnicas de análisis genético – molecular

VI.2.1 Extracción de ADN total

Las colonias bacterianas crecidas en LBA durante 8h a 37°C, se cosechan con ayuda de una espátula estéril y se colocan en un microtubo para agregar 400 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 100mM pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100mM, EDTA 50mM), agitándose vigorosamente durante 10 min. A continuación se agregan 400 µL de cloroformo y se agita en vórtex durante 5 min. Se centrifuga durante 10 min a 10, 000 rpm y el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio cuidando de no arrastrar la fase orgánica. Se extrae con un volumen de fenol-cloroformo, centrifugando durante 5 min a 10, 000 rpm y el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio. Se precipita el ADN con 1 volumen de isopropanol frío incubando 10 min a -20°C y centrifugando durante 10 min a 10, 000 rpm, el sobrenadante se desecha y la pastilla se lava 2 veces con 250 µL de etanol 70% y se deja

secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en un volumen mínimo de agua, aproximadamente 20 μ L. La integridad del ADN obtenido se visualiza desarrollando una electroforesis en gel de agarosa al 1%, empleando técnicas convencionales (Sambrook y col., 2001). El ADN aislado se guarda a -20°C hasta su utilización.

VI.2.2 Amplificaciones del ADN por PCR

Se utilizan pares de iniciadores dirigidos a genes de patogenicidad para *E. coli* diarreagénica (Tabla V); al gen 16S de RNA ribosomal (Tabla VI); genes específicos de resistencia a antibióticos (Tabla VII) y cobre (Tabla VIII) y a la presencia de integrones (Tabla IX). La composición de la mezcla de incubación para la PCR es la siguiente: Tris-HCl pH 9.0 10 mM, MgCl₂ 1.0 mM, 0.2 mM de cada deoxinucleosido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5Mm de cada iniciador, 0.5 U de Taq polimerasa y 25 ng de ADN en un volumen total de 25 μ L. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos, desnaturalización a 94 °C por 45 seg, alineamiento de 51°C a 71°C por 45 seg (esta temperatura será distinta para cada tipo de iniciadores empleados) y extensión a 72 °C por 45 seg. Después de completados los 35 ciclos, una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos obtenidos se visualizan en geles de agarosa al 1% empleando técnicas convencionales (Sambrook y col., 2001).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

Tabla V. Iniciadores para la amplificación de genes presentes en *E. coli* diarreagénica

ESPECIFICIDAD	GEN	CLAVE DEL OLIGO	SECUENCIA (5' → 3')	TAMAÑO DE FRAGMENTO (pb)
ETEC	LT	LT-1	GCGACAAATTATACCGTCT	708
		LT-2	CCGAATTCTGTTATATATGT	
ETEC	ST	ST-1	CTGTATTTGTCTTTTTTCACCT	182
		ST-2	GCACCCGGTACAAGCAGGAT	
EIEC	IpaH	EI-1	GCTGGAAAACTCAGTGCCT	424
		EI-2	CCAGTCCGGTAAATTCATTCT	
EPEC	BFP	EP-1	CAATGGTGCTTGCGCTTGCT	324
		EP-2	GCCGTTTATCCAACCTGGT	

Harris, 1998; Tornieporth, 1995

Tabla VI. Iniciadores para la amplificación del gen 16S de RNA ribosomal

ESPECIFICIDAD	GEN	INICIADOR	SECUENCIA (5' → 3')	TAMAÑO DE FRAGMENTO (pb)
Enterobacterias	16S	ECA 75F	GGAAGAAGCTTGCTTCTTGCTGAC	544
		ECR 619R	AGCCCGGGGATTTCACATCTGACTTA	

Sabat y col., 2000

Tabla VII. Iniciadores para la amplificación de regiones que codifican para la resistencia a antibióticos

ANTIBIÓTICO	GEN	INICIADOR	SECUENCIA (5' → 3')	TAMAÑO (pb)
Tetraciclina	<i>tetA</i>	TetA-L	GGC GGT CTT CTT CAT CAT GC	502
		TetA-R	CGG CAG GCA GAG CAA GTA GA	
	<i>tetB</i>	TetB-L	CAT TAA TAG GCG CAT CGC TG	930
		TetB-R	TGA AGG TCA TCG ATA CGA GG	
	<i>tetC</i>	TetC-L	GCT GTA GGC ATA GGC TTG GT	888
		TetC-R	GCC GGA AGC GAG AAG AAT CA	
Sulfonamidas	<i>su1</i>	Sul1-L	GTG ACG GTG TTC GGC ATT CT	779
		Sul1-R	TCC GAG AAG GTG ATT GCG CT	
	<i>su2</i>	Sul2-L	CGG CAT CGT CAA CAT AAC CT	721
		Sul2-R	TGT GCG GAT GAA GTC AGC TC	
	<i>su3</i>	Sul3-F	GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG	880
		Sul3-R	CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA	

Boerlin y col., 2005

Tabla VIII. Iniciadores para la amplificación de regiones que codifican para la resistencia a metales

METAL	GEN	INICIADOR	SECUENCIA (5' → 3')	TAMAÑO (pb)
Cobre	<i>copA</i>	copA F	CTT TAC GGA CTT TTA CCC GCC	3,000
		copA R	GCG GCG GCC GCC TTT GGG AAG TTG AAA AC	

Rensing y col., 1999.

Tabla IX. Iniciadores para la amplificación de regiones que codifican para Integrones

DETERMINANTE	GEN	CLAVE DEL INICIADOR	SECUENCIA (5' → 3')	TAMANO DEL FRAGMENTO (pb)
Integrón	Segmento conservado	5'-CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	Variable
		3'-CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA	

Chang y col., 2000.

VI.2.3 Extracción y limpieza del producto de PCR

Una vez realizada la PCR, se realiza la extracción y limpieza del producto de PCR del gel de agarosa al 1 %, que se lleva a cabo con el kit QIAEX® II (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El producto purificado que se obtenga, se utilizará en la reacción de PCR de secuenciación.

VI.2.4 Secuenciación de los productos de PCR purificados

VI.2.4.1 PCR de secuenciación.

Para la PCR de secuenciación se utiliza el Kit BigDye® Terminator V3.1 (Applied Biosystems Inc, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se realiza la reacción de PCR de secuenciación bajo los siguientes parámetros: un ciclo inicial de desnaturalización a 96 °C por 40 seg; 35 ciclos de amplificación a 96 °C por 15 seg, 50 °C durante 20 seg y 60 °C por 2.20 min. La reacción de secuenciación se lleva a cabo en un RapidCycler (Idaho Technologies, Inc.).

VI.2.4.2 Purificación del producto de PCR de secuenciación.

Esta técnica se implementará transfiriendo los 15 μ L de PCR de secuenciación, que se obtendrán del paso anterior a un microtubo de 1.5 mL en el cual se agregan 2 μ L de EDTA (125 mM), 2 μ L de acetato de sodio (3 M, pH 4.8), y 50 μ L de etanol absoluto, se mezcla suavemente en el vortex por 3 seg, e incuba 30 min a -20 °C, una vez transcurrido el tiempo se centrifuga durante 30 min a 13000 rpm, se descarta el sobrenadante y se adicionan 250 μ L de etanol al 70 % mezclando suavemente, se lleva a centrifugación 15 min a 13 000 rpm, se descarta el sobrenadante y la pastilla se seca en el condensador (LABCONCO, Kansas City, USA) durante 7 min a 35 °C, una vez terminado el tiempo se resuspende en 15 μ L de HiDi. La secuencia del producto que se obtiene se realiza con el secuenciador ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

VI.2.5 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se comparan mediante el algoritmo BLAST con las secuencias depositadas en el GenBank.

Para generar un dendograma con las secuencias obtenidas primero se realizó un análisis de homología por comparación con las secuencias similares depositadas en el Gen Bank. Se utilizó el software de comparación entre secuencias BLAST disponible en el sitio de Internet del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA). Se seleccionaron las secuencias que presentaron la mayor identidad con cada uno de las secuencias obtenidas en el presente trabajo y se realizó un alineamiento múltiple empleando el algoritmo ClustalX (Thompson y col., 1997) editando las secuencias para la optimización del alineamiento mediando el programa BioEdit (Hall, 1999). A partir del alineamiento múltiple generado se construyeron los dendogramas empleando el paquete MEGA 4.0 (Kumar y col., 2004) calculando las distancias genéticas con el algoritmo Jukes Cantor y generando los patrones de agrupamiento mediante el criterio Neighbor-Joining.

VII. RESULTADOS

VII.1 Ensayos de tipificación genético molecular

El ADN extraído tanto de las cepas de estudio como de las cepas de referencia mostró buenos rendimientos e integridad (Fig. 1).

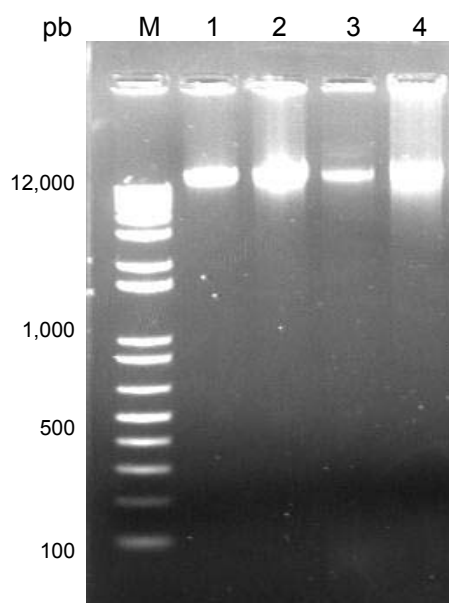


Figura 1. ADN total de los aislados bacterianos

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); Carriles 1 a 4, ADN extraído de 4 aislados bacterianos.

A partir del ADN obtenido se realizaron ensayos de amplificación por PCR con iniciadores específicos para la detección de los patotipos de *E. coli* (ETEC LT, ETEC ST, EPEC, y EIEC) de los aislados clínicos de Enterobacterias, se obtuvieron 18 amplicones del tamaño esperado solo para la toxina LT (708 pb) y de estas muestras 5 amplificaron además para la toxina ST (182 pb) de ETEC. En el resto de los aislados clínicos de dichas Enterobacterias no se obtuvo amplificación positiva para los otros grupos patógenos (Fig. 2).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

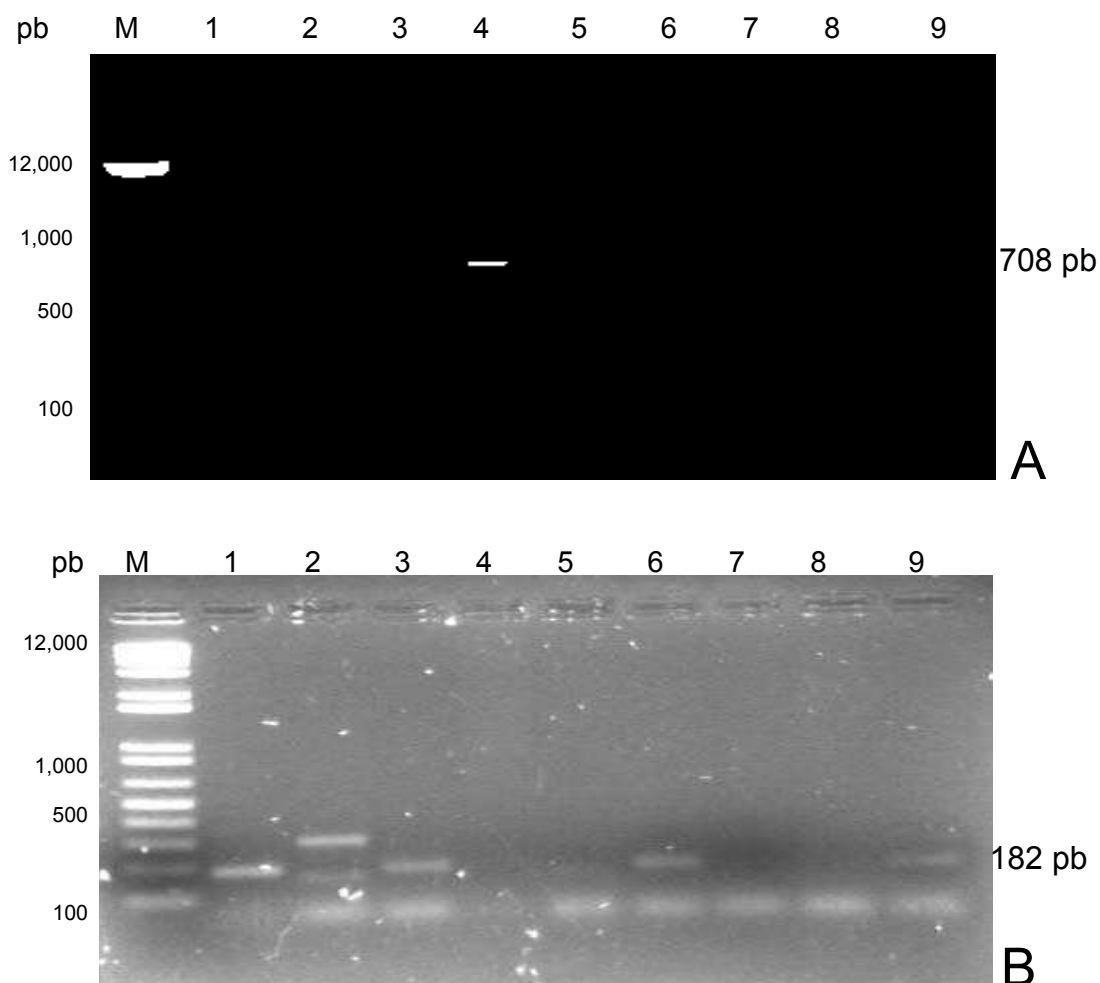


Figura 2. Detección de patotipos

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (A) Patrones de amplificación obtenidos mediante los iniciadores para ETEC LT. (B) Patrones de amplificación obtenidos mediante los iniciadores para ETEC ST. Carriles: M, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 1, amplicón obtenido con la cepa de referencia ETEC-LT (A) y ETEC-ST (B), usadas como control positivo y carriles 2 a 9, cepas de estudio (A y B).

El 37% de los aislados clínicos provenientes de pacientes con cuadro diarreico presentaron genes de patogenicidad y ninguno de los aislados de pacientes sanos los presentaron (Tabla X).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

Tabla X. Porcentajes de Enterobacterias patotipificadas como ETEC

GEN	PORCENTAJE	
	Enterobacterias de pacientes sanos	Enterobacterias de pacientes con cuadro diarreico
LT	0%	37% (13)
ST	0%	0%
LT Y ST	0%	5% (5)
NINGUNO	100%	58%

Para corroborar los resultados de tipificación por BIOLOG, se amplificó el gen 16S de RNAr usando iniciadores específicos para Enterobacterias y se obtuvo el amplicón del tamaño esperado de 544 pb en todos los aislados clínicos (Fig. 2).

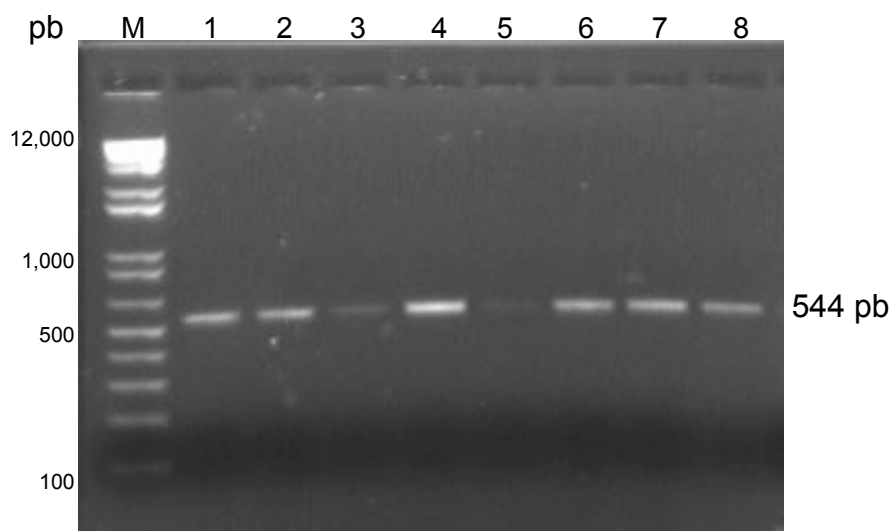


Figura 3. Tipificación de los aislados bacterianos mediante PCR del gen 16S de RNAr. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 1 y 2 amplicones de cepas de referencia; 3 a 8, amplicones obtenidos de los aislados clínicos de estudio.

Se cortaron los amplicones obtenidos y se llevo a cabo la metodología para la secuenciación, el análisis de las secuencias obtenidas mediante el algoritmo BLAST en el GenBank. Con lo cual se observó que 94% de los aislados pertenecen a *E. coli* y el 6% a *Morganella morganii* (Tabla XI). Es importante mencionar que los aislados clínicos que son *E. coli*, el 20% presenta genes de patogenicidad del patotipo ETEC; por otra parte se observó que en 2

de los 5 (40%), aislados clínicos tipificados como *Morganella morganii* corroborados por la secuenciación del gen 16S de RNAr, presentan genes de patogenicidad de ETEC.

Tabla XI. Porcentaje de Enterobacterias tipificadas mediante PCR y secuenciación del gen 16S de RNAr.

PORCENTAJE			
TOXINA	ETEC (16 cepas)	<i>E. coli</i> comensales (64 cepas)	<i>M. morganii</i> ss <i>morganii</i> (5 cepas)
LT	81 % (13/16)	0%	0%
ST	0%	0%	0%
LT y ST	19% (3/16)	0%	40% (2/5)
Ninguno	0%	100% (64/64)	60% (3/5)
TOTAL	100% (16)	100% (64)	100% (5)

Mediante la construcción del dendograma con las secuencias obtenidas de los aislados clínicos de las Enterobacterias y de las cepas de referencia se corroboró que la mayoría de los aislados efectivamente son *E. coli*, ya que podemos observar que se agrupan en una rama, además observamos otra rama donde se resuelven aislados como parte del género *Morganella morganii* y un pequeño grupo que no se resuelve y que resulta interesante identificar mediante el estudio de genes del metabolismo primario (Fig. 4).

VII.2 Regiones genéticas asociadas con la resistencia a tetraciclina y sulfonamidas

Por otra parte se detectaron tres determinantes genéticos responsables de la resistencia a tetraciclinas [*tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)*], mediante la amplificación por PCR en los aislados clínicos (Fig. 5). De acuerdo a los resultados, observamos que la resistencia múltiple es más frecuente que la resistencia simple en este tipo de antibiótico y esto probablemente se debe a que los genes que codifican para la resistencia se encuentran en elementos genéticos translocables denominados transposones, responsables de la acumulación de genes de resistencia en los plásmidos, asegurando la prevalencia de los determinantes de resistencia en Enterobacterias comensales o patógenas.

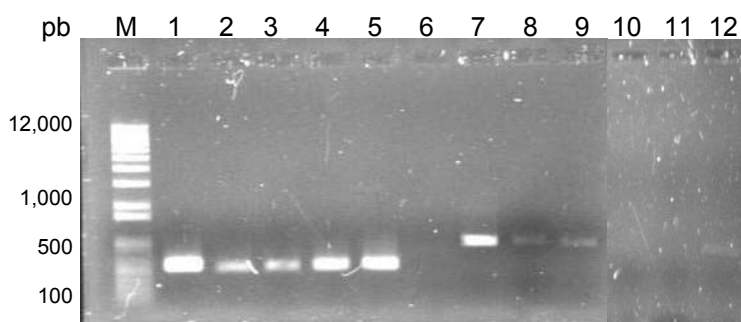


Figura 5. Detección de los genes *tet* en las Enterobacterias de estudio.

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 1 a 6, amplicones con iniciadores para *tetA*; 6 a 9 con iniciadores para *tetB* y 10 a 12 con iniciadores para *tetC*.

El gen *tetA* se encontró en el 13% de los aislados, *tetB* en el 32%, ninguna presentó *tetC* y el 43% presentó tanto *tetA* como *tetB*. En *E. coli* comensal, se encontró el gen *tetA* en el 21%, *tetB* en el 24%, *tetC* en el 6% y en el 12% de los aislados se encontró tanto *tetA* como *tetB*. Los 5 aislados de *Morganella morganii* presentaron los genes *tetA* y *tetB* (tabla XII).

Tabla XII. Porcentajes de genes *tet* de las Enterobacterias

GEN BLANCO	ETEC (16 cepas)	<i>E. coli</i> comensales (64 cepas)	<i>M. morganii</i> ss morganii (5 cepas)
<i>tetA</i>	13% (2/16)	24% (15/64)	80% (4/5)
<i>tetB</i>	32% (5/16)	27% (17/64)	0%
<i>tetC</i>	0%	6% (4/64)	0%
<i>tetA</i> y <i>tetB</i>	43% (7/16)	9% (6/64)	20% (1/5)
<i>tetA</i> y <i>tetC</i>	6% (1/16)	3% (2/64)	0%
<i>tetB</i> y <i>tetC</i>	0%	3% (2/64)	0%
Ninguno	6% (1/16)	28% (18/64)	0%
TOTAL	100%	100%	100%

Se construyó el dendograma, para el gen *tetA* con 14 secuencias que incluyen cepas de *E. coli* comensal, ETEC-LT y *M. morganii* comensal y con ambas toxinas, podemos observar que presentan poca variación genética, además se separan de las secuencias depositadas en el GenBank, y no se observa variación genética en estas secuencias, sin embargo, dos cepas de *E. coli* de nuestro trabajo, una cepa comensal y una cepa patógena (ETEC LT 16) se encuentran en una rama muy distante del resto de nuestras cepas y esto indica que probablemente tuvieron una mayor presión selectiva y por eso presentan mayor variación genética (Fig. 6).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

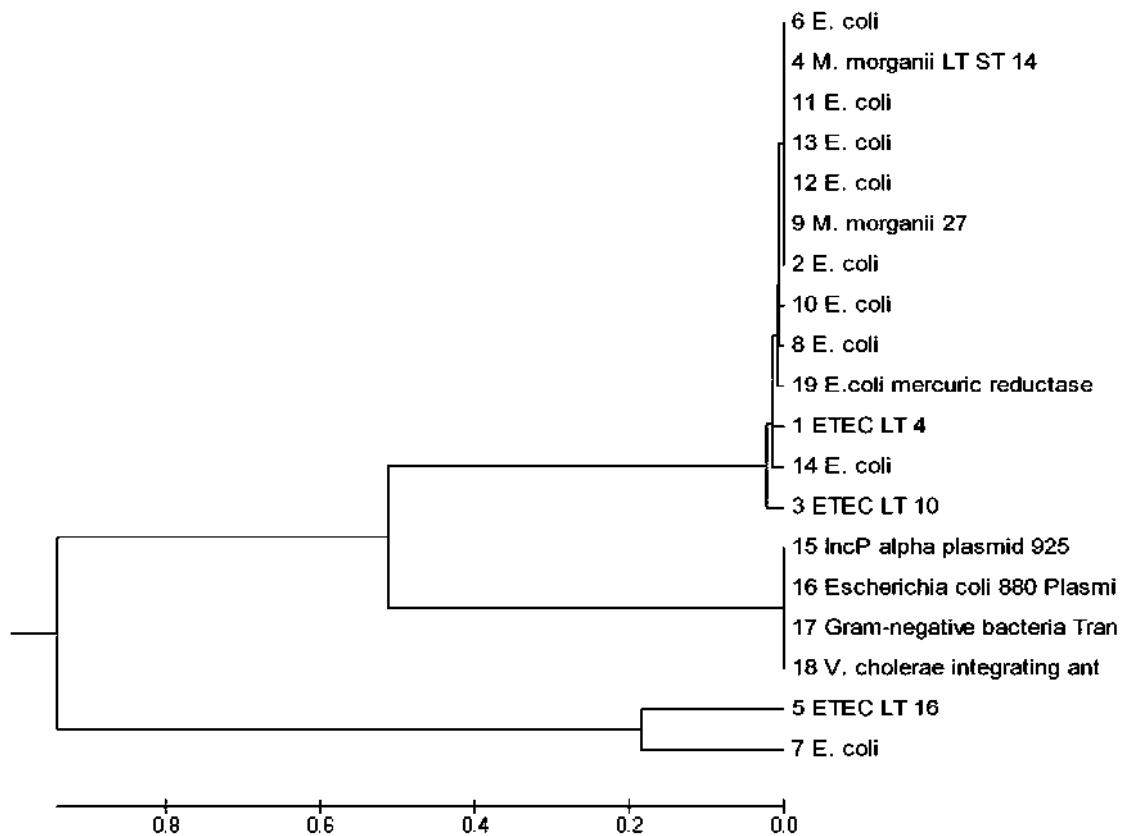


Figura 6. Dendrograma del gen *tetA*

El dendrograma del gen *tetB* se construyó con 22 secuencias, las cuales abarcan todos los genotipos que identificamos por secuenciación del gen 16S y genes de patogenicidad de ETEC, podemos hacer una comparación con *tetA* y *tetB* observando mayor variación genética en *tetB*. Además las secuencias del GenBank, no se distinguen con la de nuestros aislados, lo cual pudiera indicar que el gen *tetB* se encuentra diseminado en mayor proporción a nivel mundial (Fig. 7).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

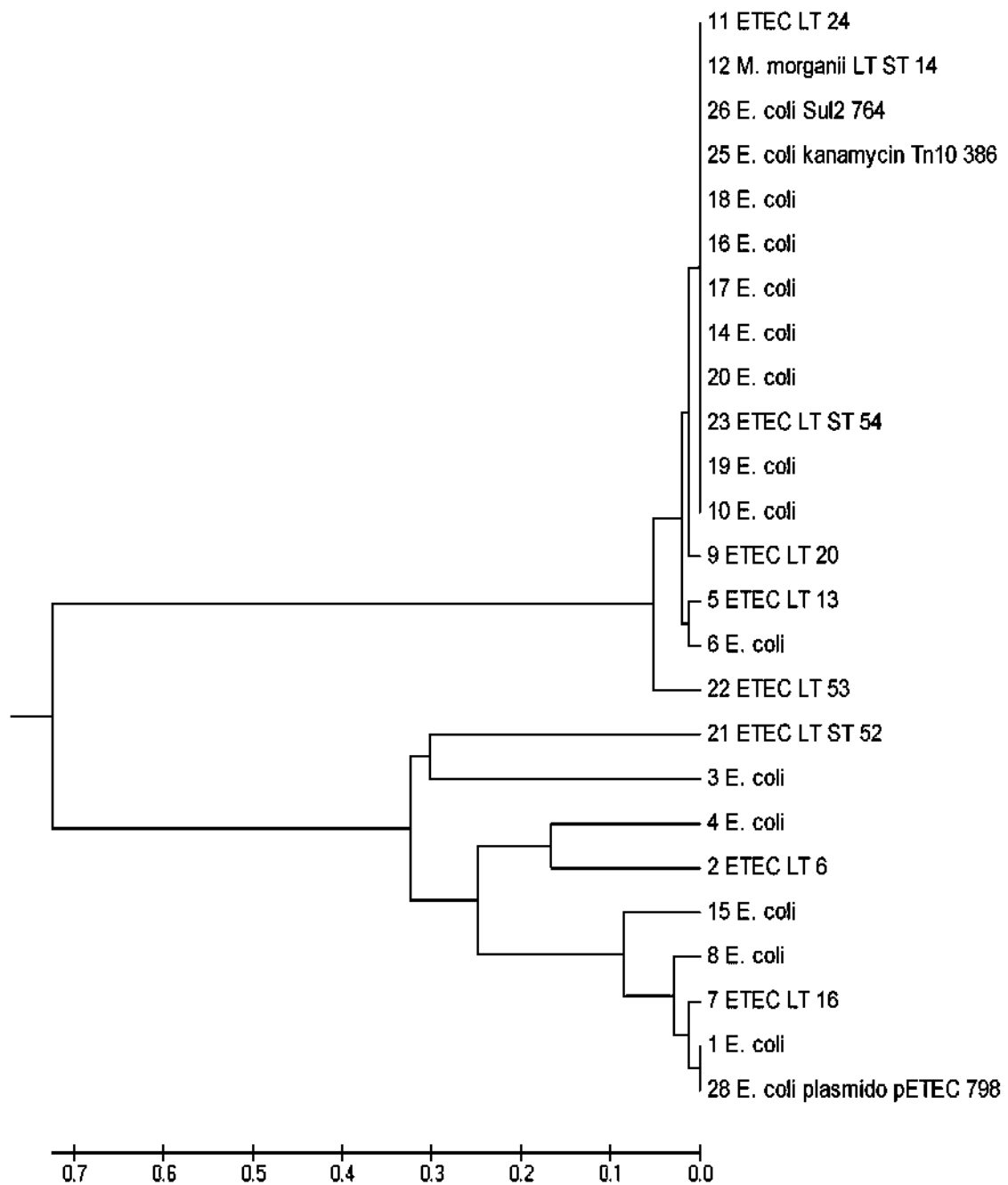


Figura 7. Dendrograma del gen *tetB*

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

Se analizó la distribución y diversidad de los determinantes genéticos responsables de la resistencia a sulfonamidas mediante la amplificación PCR de los genes *sul*. Se amplificó el fragmento esperado de 779 pb con iniciadores para el gen *sul1* (Fig. 8); el total de las cepas dio amplificación positiva del fragmento de 721 pb del gen *sul2* (Fig. 10). El gen *sul3* solo amplificó en 15 de las cepas analizadas dando el fragmento de 880 pb esperado (Fig. 12).

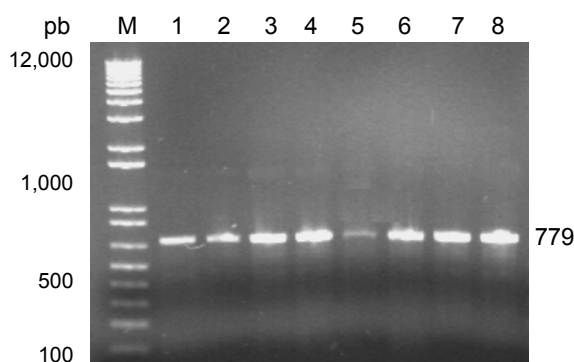


Figura 8. Detección del gen *sul1*

Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 1 a 8, amplicones del gen *sul1* de Enterobacterias.

Se construyó el dendograma con 55 secuencias de las Enterobacterias de estudio, podemos observar que presentan gran variación genética, ya que podemos observar que se dividen de distintas ramas y se encuentran separadas de las secuencias depositadas en el GenBank, e incluso al hacer una comparación con los dendogramas anteriores de resistencia a Tetraciclinas, se observa una variación mayor en el gen *sul1* que los genes *tet* (Fig. 9).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

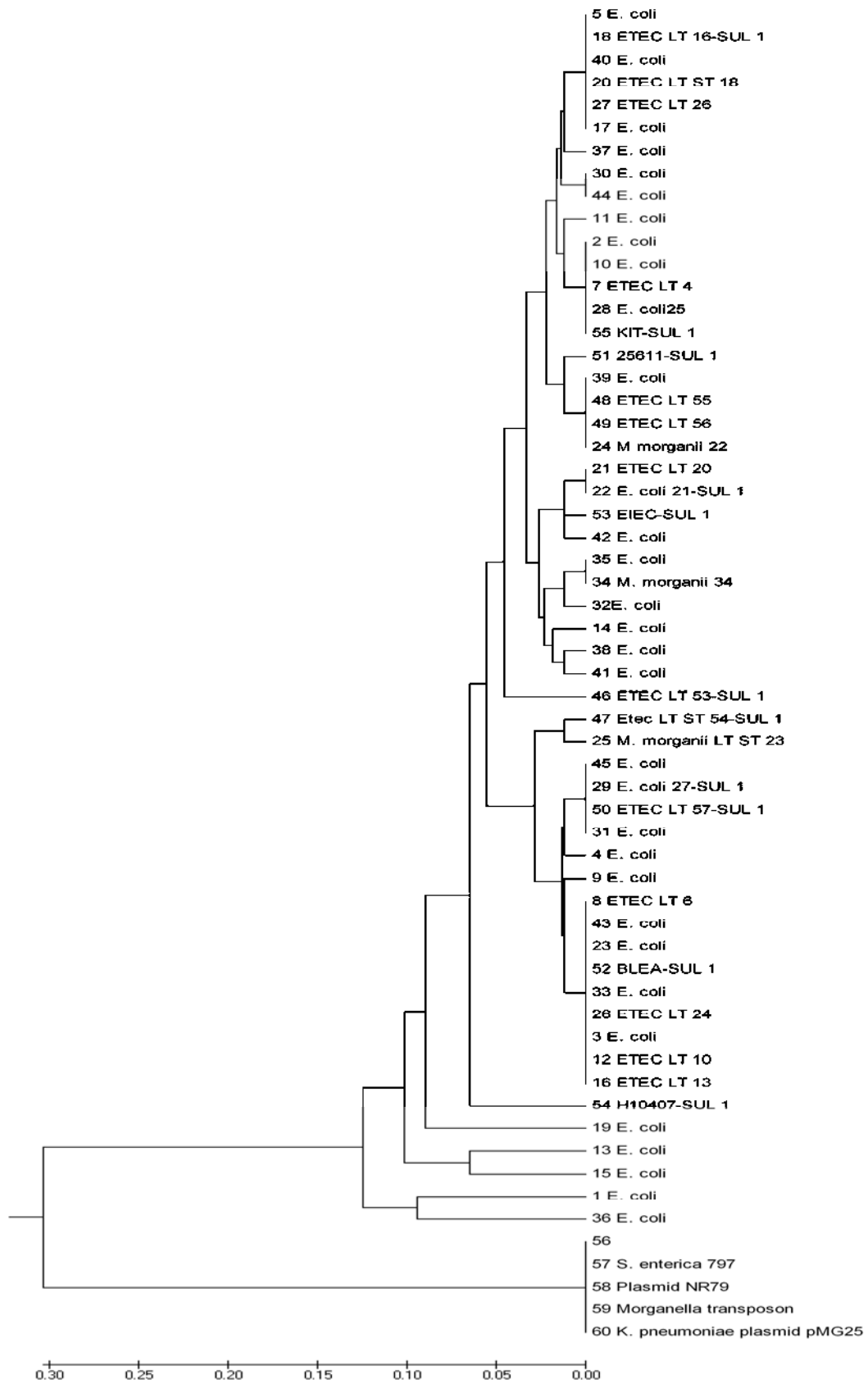


Figura 9. Dendrograma del gen *su1*

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

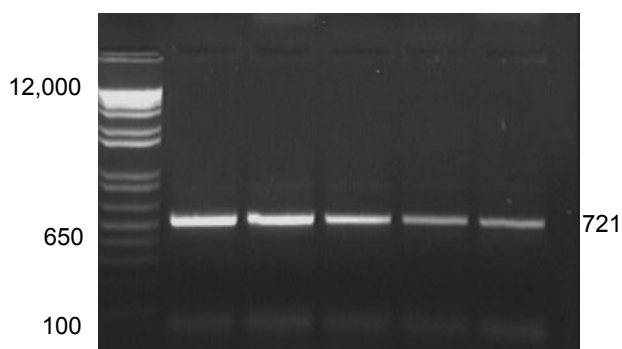


Figura 10. Detección del gen *su2*

Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 1 a 5, amplicones del gen *su2* de Enterobacterias.

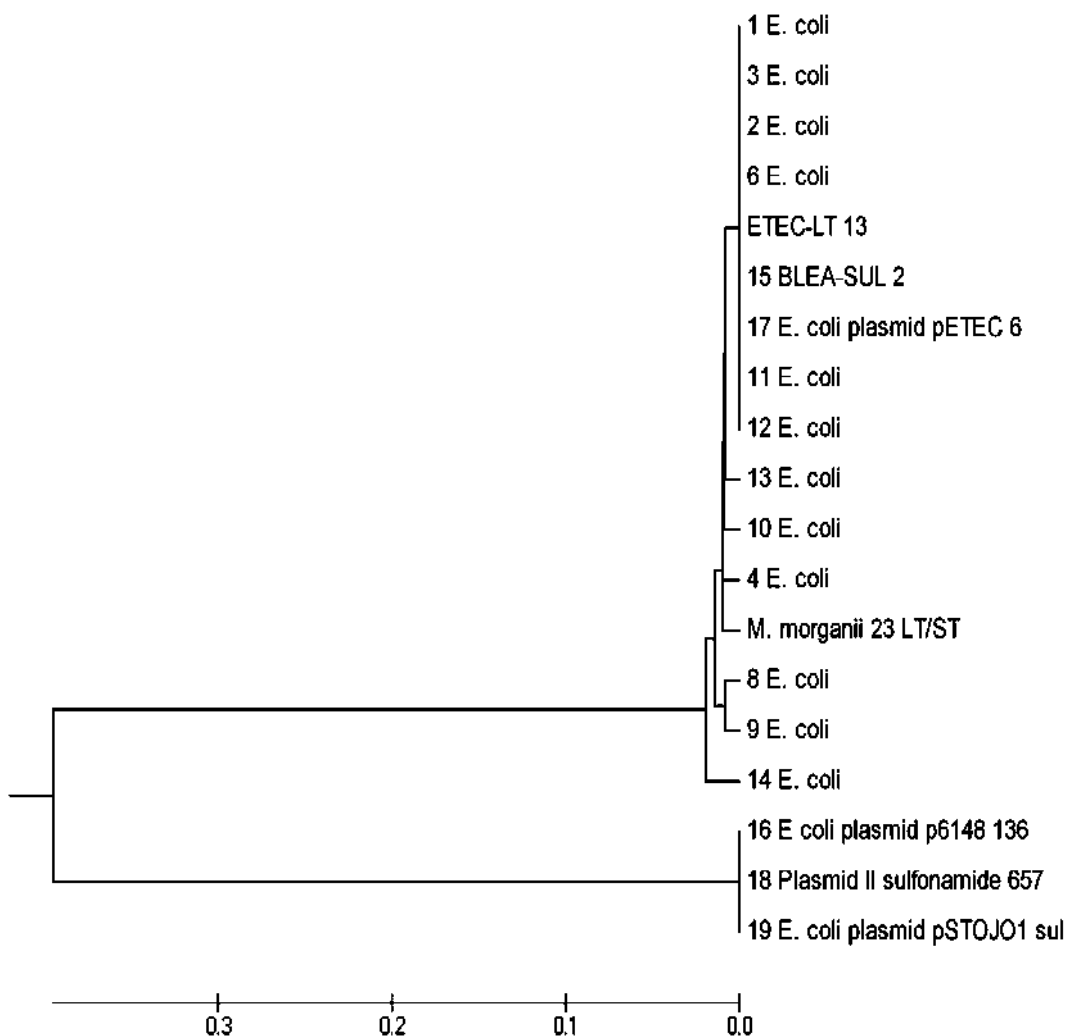


Figura 11. Dendograma del gen *su2*

El dendograma del gen *su2* se construyó con 15 secuencias, podemos observar menor variación genética en *su2* respecto de *su1* e incluso ser el que menos variación presenta con respecto a los genes *tetA*, *tetB* y *su1*. Además a

excepción de una secuencia del GenBank de ETEC, las demás secuencias del Gen Bank, se separan de nuestros aislados (Fig. 11).

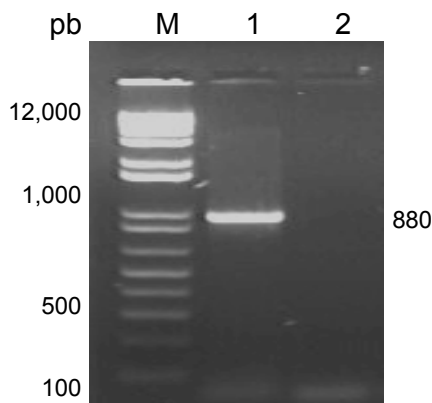


Figura 12. Detección del gen *su3*

Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M: Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 1 y 2, aislados clínicos de Enterobacterias.

Los porcentajes de distribución de los genes *sul* en las cepas analizadas se muestran en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Porcentajes de genes *sul* de las Enterobacterias

GEN BLANCO	PORCENTAJE		
	ETEC (16 cepas)	<i>E. coli</i> comensales (64 cepas)	<i>M. morganii</i> ss morganii (5 cepas)
<i>su1</i>	25% (4/16)	16% (10/64)	0%
<i>su2</i>	6% (1/16)	31% (20/64)	0%
<i>su3</i>	0%	0%	0%
<i>su1</i> y <i>su2</i>	31% (5/16)	39% (25/64)	60% (3/5)
<i>su1</i> y <i>su3</i>	19% (3/16)	1%(1/64)	20% (1/5)
<i>su2</i> y <i>su3</i>	0%	0%	0%
Ninguno	0%	5% (3/64)	0%
<i>su1</i> , <i>2</i> y <i>3</i>	19% (3/16)	8% (5/64)	20% (1/5)
TOTAL	100%	100%	100%

En nuestro trabajo, se encontró el gen *su1* en el 16% (12/64) de *E. coli* comensales y en 25% (4/16) de ETEC; el gen *su2* se encontró en el 31% (23/64) de *E. coli* comensales y en 6% (1/16) de ETEC; se encontró la combinación de *su1* y *su2* en el 39% (29/64) de *E. coli* comensales, en 31% (5/16) de ETEC y en *M. Morganii* en 60% (3/5). El gen *su3* solo amplificó en 15 de las cepas dando el fragmento de 880 pb esperado, y solo se observó en combinación con el gen *su1* (*su1* y *su3*) o en presencia de *su1* y *su2* (*su1*, *su2* y *su3*).

VII.3 Región genética asociada con la resistencia a cobre

Se analizó la distribución y diversidad del determinante genético responsable de la resistencia a cobre mediante la amplificación PCR del gen *copA*, el cual se detectó en un gran número de las Enterobacterias analizadas (Fig. 13).

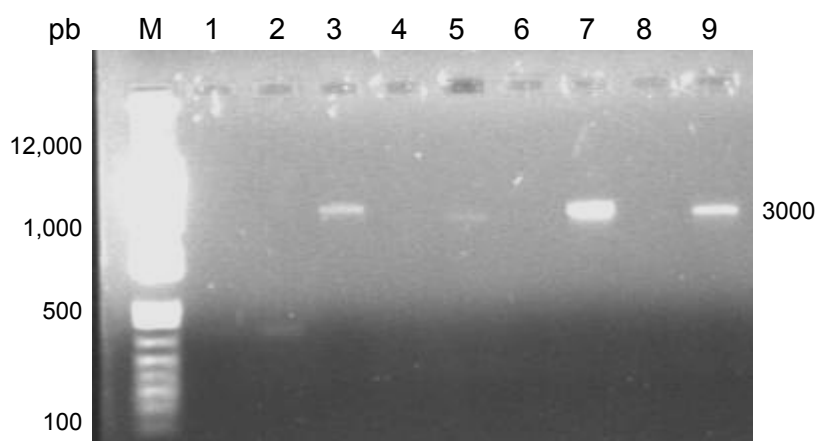


Figura 13. Detección del gen *copA*

Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M: Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 1 a 9, aislados clínicos de Enterobacterias.

Los porcentajes de distribución del gen *copA* en las cepas analizadas se muestran en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Porcentajes del gen *copA* de las Enterobacterias

GEN <i>copa</i>	ETEC (16 cepas)	<i>E. coli</i> Comensales (64 cepas)	<i>M. morganii</i> ss <i>morganii</i> (5 cepas)
Presente	81% (13/16) (3 LT-ST)	60% (38/64)	80% (4/5) (3 LT-ST)
Ausente	19% (3/16)	40% (26/64)	20% (1/5)
TOTAL	100% (16/16)	100% (64/64)	100% (5/5)

El dendograma del gen *copA* se construyó con 41 secuencias, podemos observar variación genética por un lado y a excepción de una secuencia del Gen Bank de una probable proteína de transporte de cobre, las demás secuencias del Gen Bank se separan de nuestros aislados, lo cual pudiera ser indicador de un origen común y después se hayan dispersado a distancias geográficas (Fig.14).

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

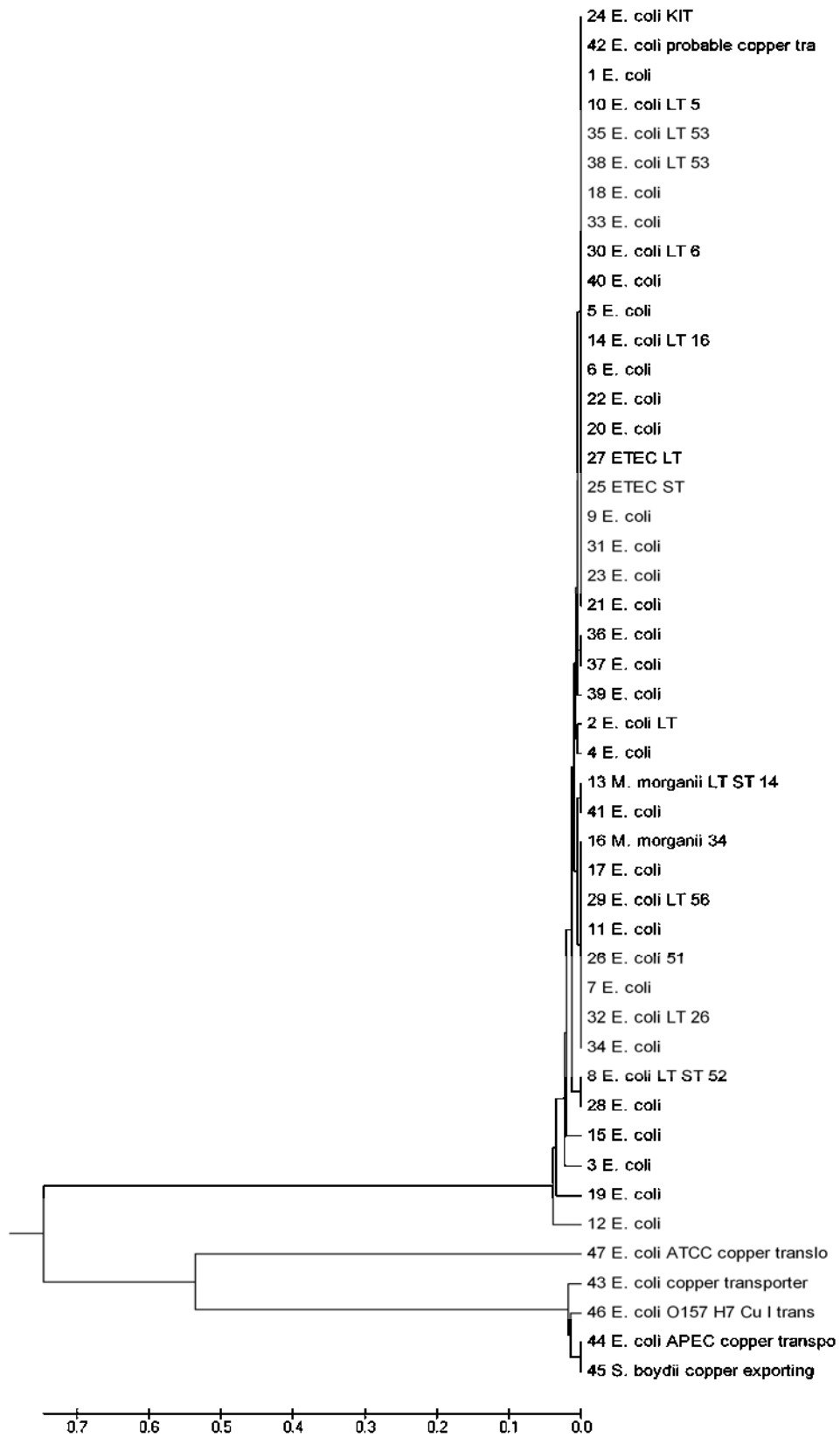


Figura 14. Dendrograma del gen *copa*

VII.3 Región genética asociada con la presencia de integrones clase 1

Se analizó la distribución y diversidad del determinante genético responsable de la multirresistencia a antibióticos y desinfectantes y antisépticos a través del estudio de los integrones de clase 1, mediante la amplificación PCR de los segmentos conservados de los integrones de las Enterobacterias (Fig. 15).

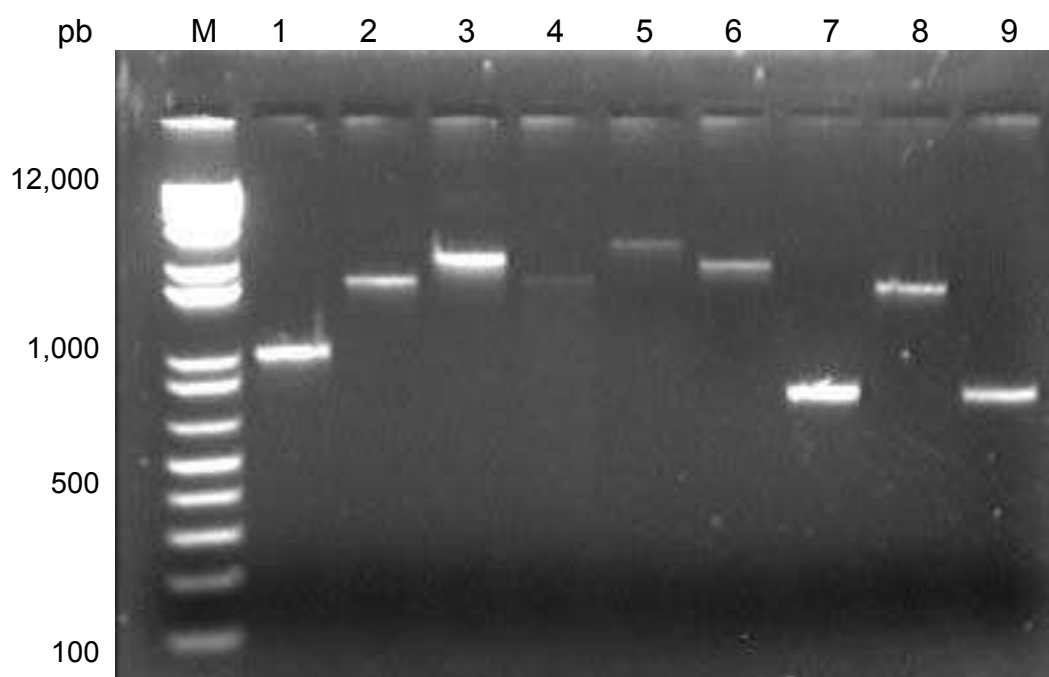


Figura 15. Amplificación de Integrones de clase 1.

Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M: Marcador de Peso Molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 1 a 9, aislados clínicos de Enterobacterias.

En nuestro trabajo obtuvimos amplicones de 500 hasta 5000pb.

Los porcentajes de distribución de los integrones en las cepas analizadas se muestran en la Tabla XV.

Tabla XV. Porcentaje de integrones clase 1

INTEGRONES	ETEC (16 cepas)	<i>E. coli</i> Comensales (64 cepas)	<i>M. morganii</i> ss <i>morganii</i> (5 cepas)
Presente	81% (13/16)	52% (33/64)	40% (2/5)
Ausente	19% (3/16)	48% (31/64)	60% (3/5)
TOTAL	100% (16/16)	100% (64/64)	100% (5/5)

La frecuencia encontrada de estos genes coincide con la reportada en otros trabajos para aislados de *E. coli* en otros países de Latinoamérica y sugieren que las Enterobacterias tienen un papel importante en la emergencia y diseminación de la resistencia a estos antibióticos ya que en nuestro estudio se observaron además otros genes de resistencia a aminoglucósidos (*addA5*, *addA4*, *addA2*), genes de resistencia a β -Lactámicos (*blaOXA-2*, *blaCTX-M-2*), genes de resistencia a trimetropim (*dfrA7*, *dfrI7*) y sulfonamidas (*sul1*, *sul3*), macrolidos (*metB*), así como compuestos de amonio cuaternario (*qacEdelta1*).

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Tipificación genético molecular bacteriana

La tipificación de los aislados clínicos de las enterobacterias de nuestro estudio mostró que el 75% es *E. coli* comensal, 19% es *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), y el 6% *M. morganii*, ya que hubo 4 aislados que se agruparon de manera distinta a *E. coli* y *M. morganii*, puede ser necesario el estudio de otros genes del metabolismo basal, para confirmar su identidad.

Las técnicas de tipificación molecular empleadas en el presente trabajo, PCR y secuenciación, son técnicas de punta en investigación, ya que estas son técnicas con alta especificidad y sensibilidad, son fáciles de desarrollar, se obtienen resultados de manera rápida. (Maslow y col., 1993, Soll y col., 2003). Por lo que concluimos que la secuenciación, del ADNr 16S constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana, del cual puede beneficiarse la microbiología clínica.

VIII.2 Genes de patogenicidad en Enterobacterias

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de amplificación PCR mostraron que el grupo patógeno predominante de *Escherichia coli* en las muestras problema fue ETEC con un 19%, de estos el 81% (13/16) presentaron el gen para la toxina LT y en menor porcentaje la toxina LT y ST; un dato importante lo aporta *M. morganii*, ya que 2 aislados presentaron ambos genes de virulencia lo cual sugiere que estas bacterias oportunistas nosocomiales pueden agregar estos genes probablemente por transferencia horizontal mediante elementos genéticos (Bennet, 2008; Koonin y col., 2001), dicho resultado concuerda con lo descrito en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a antibióticos que elabora el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para la vigilancia (2000), donde en México se obtuvo, el 46% como ETEC, EIEC 8%, EPEC 5%, EHEC 2% y 39% *E. coli* no patógena, a excepción de *M. Morganii* que, es también una Enterobacteria, pero que se presenta solo en infecciones intrahospitalarias, es causa de infecciones tanto del tracto urinario como de heridas y ha sido implicada como causa de diarrea,

(Koneman, 2003) pero no existen datos específicos para México. *E. coli* es la causa predominante de la alta prevalencia de diarrea en países en vías de desarrollo, como África, Asia, el Caribe y Latinoamérica. ETEC y EAEC son los responsables del 71% de los casos de diarrea en México. Patógenos invasivos como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella* son relativamente comunes dependiendo de la región.

Entre los niños menores de 5 años en desarrollo, la carga de la diarrea anual se estima en 1,5 millones de episodios, con 3 millones de muertes. En estudios basados en la comunidad de los niños en estos valores, *Escherichia coli* enterotoxigenica (ETEC) es el enteropatógeno aislado más frecuentemente, que representan aproximadamente 210 millones de episodios de diarrea con aproximadamente 380 000 muertes anuales.

Los resultados permiten suponer que la fuente, diseminación y la frecuencia de circulación de las cepas en las áreas estudiadas son distintas y que sus comportamientos particulares obedecen a una dinámica geográfica local de las relaciones entre el hospedero, *E. coli* y *M. morganii* y el ambiente.

Estudios realizados con aislados clínicos de EHEC muestran que hay una alta resistencia a antibióticos muy usados anteriormente como ampicilina, oxitetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol y que está emergiendo una resistencia a gentamicina y ciprofloxacina (Nys y col., 2004). Este comportamiento parece ser el mismo que están siguiendo los aislados de ETEC, al menos los de la muestra de este trabajo.

VIII. 3 Resistencia a tetraciclina

Pese a que los antimicrobianos suministrados a niños son más restringidos que los de adultos, la resistencia observada al marcador *tet*, indicaría que la colonización de la flora intestinal a través de la transmisión de bacterias multirresistentes presentes en la comunidad, es muy común, por lo que los niños portarían bacterias multirresistentes a antibióticos a los cuales no habrían estado necesariamente expuestos (Rodas y col., 2005).

La flora comensal del tracto gastrointestinal está sujeta a una exposición frecuente a los antibióticos, sobre todo de aquellos que se administran por vía oral, sería un reservorio importante de genes de multirresistencia con

capacidad potencial de transmisión a organismos patógenos y podría además considerarse una bacteria indicadora de la multirresistencia circulante en otros patógenos (Dang y col., 2008).

De acuerdo a los resultados, observamos que la resistencia múltiple es más frecuente que la resistencia simple en las tetraciclinas, es decir la presencia de más de un gen *tet* y esto probablemente se debe a que los genes que codifican para la resistencia se encuentran en elementos genéticos translocables denominados transposones, responsables de la acumulación de genes de resistencia en los plásmidos, asegurando la prevalencia de los determinantes de resistencia en Enterobacterias comensales o patógenas (Marti y col., 2006; Roberts y col., 2005).

El gen *tetA* se encontró en el 21% (16/64) de las cepas de *E. coli* comensales, en 13% (2/16) ETEC y 80% (4/5) *M. Morganii*; el gen *tetB* se encontró en 24% (18/64) de *E. coli* comensales, en 32% (5/16) de ETEC y en *M. Morganii* no se encontró; la presencia de *tetA* y *tetB* se encuentran en el 12% (7/64) de *E. coli* comensales, en el 43% (7/16) de ETEC y en el 20% (1/5) de *M. Morganii*; *tetC*, no está tan distribuido en la población estudiada ya que sólo se presentó en las cepas de *E. coli* comensales lo que indicarían probablemente que estas pueden actuar como reservorio para ese gen. En base a los resultados podemos decir que el gen *tetB* o la combinación *tetA* y *tetB* son los principales genes *tet* en las cepas estudiadas lo cual coincide con Mata y col., (2007) en un estudio realizado en cepas de *Salmonella entérica* de varias regiones de Venezuela, que reportan que el 65% de estas cepas, mostraron por lo menos un marcador de resistencia a un antibiótico que no se utiliza o son ocasionalmente prescritos en la población infantil, como es el caso de la estreptomina (40%) y la tetraciclina (38%). Otros estudios realizados en *Shigella* y *E. coli* de orígenes geográficos distintos (Hartman, y col., 2003), coinciden con nuestros resultados, debido a que en estos agentes el principal gen de resistencia a tetraciclina encontrado fue *tetB*, y Soto y col., (2003) en España reporta al gen *tetB* como el principal responsable de la resistencia a tetraciclina.

Por otro lado al hacer la construcción del dendograma con 14 secuencias de nuestras cepas, se observa que el gen *tetA* presenta poca

variación genética, se separan de las secuencias depositadas en el GenBank, y no se observa variación genética en estas secuencias, sin embargo, dos *E. coli* de nuestro trabajo, una cepa comensal y una cepa patógena (ETEC LT 16) se encuentran en una rama muy distante del resto de nuestras cepas y esto indica que probablemente tuvieron una mayor presión selectiva y por eso presentan mayor variación genética. Para el gen *tetB* se construyó el dendograma con 22 secuencias de nuestras cepas de estudio, podemos hacer una comparación con *tetA* y *tetB* observando mayor variación genética en *tetB*. Además, las secuencias del GenBank no se distinguen de nuestros aislados, lo cual pudiera indicar que el gen *tetB* se encuentra diseminado en mayor proporción a nivel mundial.

VIII.4 Resistencia a sulfonamidas

El aumento constante de la resistencia a las sulfonamidas entre los patógenos bacterianos es inquietante. La distribución de los genes *sul1* y *sul2* en Enterobacterias de diferentes partes del mundo, muestran altos niveles de resistencia a sulfonamidas, mediante la presencia del gen *sul1*, *sul2* o ambos (Grape y col., 2003).

El gen *sul3* se reportó inicialmente (1993) en *E. coli* de cerdos, ganado y aves de corral, en Alemania. En un reporte realizado en Suiza en el 2003, se reporta el primer caso del gen *sul3* en un aislado clínico de humano, ya que este gen solo había sido reportado en cerdos. El gen *sul3* presente en nuestro estudio se observó en un mayor porcentaje, comparado con otros países.

El dendograma para el gen *sul1* con 55 secuencias muestra gran variación genética en este gen y se encuentra junto con las secuencias depositadas en el GenBank, e incluso al hacer una comparación con los dendogramas anteriores de resistencia a Tetraciclinas, se observa una variación mayor en el gen *sul1* que los genes *tet*. El dendograma del gen *sul2* se construyó con 15 secuencias, se observa menor variación genética en *sul2* respecto de *sul1* e incluso menos variación con respecto a los genes *tetA*, *tetB* y *sul1*. Además a excepción de una secuencia del Gen Bank de ETEC, las demás secuencias del Gen Bank, se separan de nuestros aislados, lo cual

podría ser indicador de las distancias geográficas de donde se estudiaron dichas cepas.

VIII.5 Resistencia a cobre

Metales de transición como los iones cobre y zinc, tienen roles esenciales en la regulación genética, estructuras de enzimas, catálisis y son requeridas para el crecimiento (Coombs y Barkay, 2004). En exceso, estos iones son tóxicos, de manera que para satisfacer las demandas fisiológicas de la célula, se lleva a cabo la homeostasis, para mantener el balance dentro y fuera de la célula. En un estudio del 2000, realizado por Rensing y col., demostraron que en *E. coli*, el gen *copA*, confiere resistencia a cobre solamente, mediante una ATPasa tipo P por traslocación de iones de cobre. Este reporte coincide con la presencia de dicho gen en nuestro estudio en un 60% (38/64) de *E. coli* comensales, en 81% (13/16) de ETEC y en *M. Morganii* en 80% (4/5).

El dendograma del gen *copA* se construyó con 41 secuencias, podemos observar variación genética por un lado y a excepción de una secuencia del Gen Bank de una probable proteína de transporte de cobre, las demás secuencias del Gen Bank se separan de nuestros aislados, lo cual podría ser indicador de un origen común y después se hayan dispersado a distancias geográficas

La constante utilización de antibióticos seleccionadores de plásmidos u otros mecanismos de resistencia ha permitido la difusión de estos factores en las cepas patógenas en forma alarmante. Sin embargo, este fenómeno no es lo único que acarrea la exposición de una determinada cepa a los diferentes antibióticos, sino también resistencia a metales. En un estudio realizado por Gedek (1981) se comprobó la resistencia a sulfonamidas, tetraciclinas y cloranfenicol al emplear sales de Cobre en la alimentación de animales, a niveles de 200 y 250 ppm, demostraron que el mismo plásmido que confiere resistencia a antibióticos codificaba simultáneamente la resistencia a cobre, lo que coincide con nuestros resultados.

VIII.6 Presencia de Integrones de clase 1

En estudios fenotípicos con las cepas tipificadas en este trabajo, se observó que las cepas comensales analizadas y las cepas patógenas ETEC, mostraron multirresistencia a antibióticos (Ampicilina, Sulfonamidas y tetraciclina, entre otros) y a metales (Cu, Ag, Pb) (Rosales-Castillo, y col., 2004; Mojica-Hernández y col., 2006; Guzmán-Martínez, y col., 2007). Resultados similares fueron reportados por el Laboratorio Nacional de Referencia en su último reporte de países panamericanos.

Una gran variedad de genes de resistencia están asociados con elementos genéticos, llamados integrones. Las enterobacterias aquí estudiadas, que presentaron integrones, mostraron resistencia a sulfonamidas, hecho que se refleja por el uso frecuente de co-trimazol en el tratamiento infeccioso por *E. coli*. Tal presión selectiva, puede favorecer la adquisición y mantenimiento de resistencia a trimetoprim, por los integrones de clase 1 que contienen el gen *sul1* en el segmento conservado 3'CS (Sun Yu y col., 2003; White y col., 2001; Chang y col., 2000).

En este estudio encontramos que 87% de las cepas ETEC (14/16), presentaron integron de clase 1, 52% (33/64) de *E. coli* comensales y 40% (2/5) *M. morganii*, en comparación con un estudio donde solo el 10% de cepas de *Salmonella entérica* presentaron este clase de integron, por otra parte, un estudio realizado en Canadá (2005), reportan a *E. coli* con multirresistencia a tetraciclinas, sulfonamidas y estreptomicina/espectinomicina.

Estos datos sustentan el hecho de que los integrones son elementos genéticos ubicuos en la población bacteriana y, en este caso particular, en el género *E. coli*, y para *M. Morganii* no lo podemos generalizar ya que se estudiaron muy pocas cepas de este género.

Las cepas utilizadas en este estudio también se utilizaron en trabajos realizados por Rosales-Castillo y col., (2004), Mojica-Hernández y col., 2006 Guzmán-Martínez, y col., 2007. En estos trabajos se observó multirresistencia a distintos antibióticos además de sulfonamidas y tetraciclinas, a ampicilina y carbenicilinas los cuales pertenecen a la familia de β -Lactámicos; amikacina, gentamicina y netilmicina los cuales son aminoglucósidos, a cefalotina una cefalosporina, y se observo mayor multirresistencia en las cepas ETEC que en

E. coli comensales. Esto tiene relación con los resultados obtenidos, ya que en este trabajo no se realizaron ensayos para la detección específica de otros genes distintos a *tetA*, *tetB* y *tetC* de resistencia a tetraciclinas y *sul1*, *sul2* y *sul3* de resistencia a sulfonamidas, con la secuenciación de los segmentos conservados de los integrones, se encontraron además distintos genes casete como, *dfr17*, *dfrA7*, *dhfr1*, que codifican para la proteína dihidrofolato reductasa, de resistencia a trimetoprim; *sul1* y *sul3* para la resistencia a sulfonamidas; *aadA1*, *aadA2*, *aadA4*, *aadA5*, las cuales codifican para proteína aminoglicosidasa adeniltransferasa, para la resistencia a Aminoglicósidos; *mef(B)* que codifica para una oxidoreductasa putativa, para la resistencia a Macrolidos; *blaOXA-2*, *blaCTX-M-2*, codifican para β -lactamasas, para la resistencia a β -Lactámicos; *qacE Δ 1*, para la resistencia a Compuestos de amonio cuaternario. En este estudio, los integrones fueron localizados en plásmidos, transposones y en el cromosoma bacteriano que coincide con distintos reportes (Sun Yu y col., 2003; White y col., 2001; White y col., 2000; Chang y col., 2000, Lévesque y col., 1995).

En el contexto global las enfermedades infecciosas, significan un riesgo a la salud pública donde estas provocan anualmente la muerte de 11 millones de niños. La alta prevalencia de la multirresistencia asociada a integrones en la flora comensal y en patógenos bacterianos afecta a la población infantil, que es más vulnerable.

La frecuencia encontrada de estos genes coincide con la reportada en otros trabajos para aislados de *E. coli* en otros países de Latinoamérica y sugieren que las Enterobacterias tienen un papel importante en la emergencia y diseminación de la resistencia a estos antibióticos.

VIII. 7 Co-selección de resistencia a antibióticos y a metales

Cierto número de plásmidos contienen genes de resistencia a metales pesados y a antimicrobianos. La contaminación, bien natural, o por acción del hombre, por metales pesados es la más abundante en la actualidad. En zonas contaminadas por metales pesados, se producirá una co-selección de resistencia a los antimicrobianos como consecuencia de la presencia de ambos tipos de determinantes en el mismo plásmido. Se sabe también que hay sistemas MDR que, además de antimicrobianos, pueden expulsar detergentes, solventes y biocidas. La contaminación debida a estos compuestos producirá también la selección de bacterias resistentes a los antimicrobianos. De igual modo, el aumento de la resistencia en poblaciones de bacterias comensales puede contribuir a que también se incremente la resistencia en las poblaciones de bacterias patógenas.

En la medida que se conozcan los mecanismos de resistencia, a los antibióticos, metales pesados y biocidas, se puede esperar el desarrollo de cepas altamente resistentes, pues los mecanismos que genéticamente se activan para uno de los compuestos los puede emplear otro; se establece así una posible resistencia cruzada entre dos tipos de compuestos, que llevarían a un alza en la resistencia a antibióticos y el aumento en la prevalencia de microorganismos resistentes en los hospitales (Levy y Marshall, 2004).

Huysman y Sauer, (1994), reportan la presencia combinada de resistencia a Cobre y a otros metales pesados, indican que la resistencia múltiple no es el resultado de una combinación de estrés a los diferentes metales pesados, ya que todos los metales pesados no son normalmente investigados en una concentración elevada en el suelo o en el intestino.

Sin embargo, a partir de nuestros resultados, no es claro si estas bacterias han adquirido resistencia a metales pesados y la resistencia a los medicamentos debido a la presencia de plásmidos específicos, por mutación cromosómica, o si pertenecen a una población que es inherentemente resistente a los metales y a los antibióticos.

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES
EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

Además, el aumento de la resistencia en Cobre, junto con una mayor resistencia a los antibióticos y otros metales pesados se ha encontrado, pero en el suelo (Baker-Austin y col., 2006; Ilender, 2000).

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

- ❖ En general la tipificación genético molecular corroboró la identificación metabólica de los aislados estudiados
- ❖ Ciertas Enterobacterias necesitan corroboración de la huella genética para su tipificación.
- ❖ Las pruebas microbiológicas convencionales necesitan de pruebas adicionales para la identificación de Enterobacterias
- ❖ De los genes de resistencia a sulfonamidas, el gen *sul2* fue el más abundante, pero el gen *sul1* mostró mayor variación.
- ❖ De los genes de resistencia a tetraciclina, los genes *tetA* y *tetB* fueron los más abundantes y el gen *tetB* fue el que mostró mayor variación.
- ❖ El gen *copA* se encontró en el 70% de los aislados y mostró mucha variación.
- ❖ Los aislados presentaron integrones de diversos tamaños conteniendo genes de resistencia a distintos antibióticos
- ❖ Los aislados estudiados presentaron tanto diferencias en el número presente de determinantes genéticos de resistencia como variaciones en las secuencias de los mismos.
- ❖ Los datos aquí generados sugieren que no se justifica el uso de sulfonamidas y tetraciclina para el tratamiento de enfermedades diarreicas provocadas por *E. coli*.
- ❖ Los aislados comensales de *E. coli* son un reservorio importante de genes de resistencia a antibióticos que pueden ser transferidos a cepas patógenas.

X. CONCLUSIONES

La amplificación y secuenciación del gen 16S de RNAr permitió corroborar que las cepas tipificadas como *E. coli* y *M. morganii*, pertenecían a dichas especies.

Los distintos patrones obtenidos con los determinantes genéticos responsables de la resistencia a tetraciclinas, sulfonamidas, cobre y la presencia de integrones en *E. coli* y *M. morganii* muestran además, variación significativa en las secuencias en la población de estudio de la Ciudad de Morelia.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelowo**, O.O., Fagade, O.E. (2009). The tetracycline resistance gene tet39 is present in both Gram-negative and Gram-positive bacteria from a polluted river, western Nigeria”, *Lett. Appl. Microbiol.* 48:167-172.
- Arakawa**, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wcharotayakun, R., Oshuka, S., Kato, N., Otha, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene bla_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1612-1615.
- Arias**, B.I., Huget, T.J.C. (2002). Detección molecular de toxinas termoestable y termolábil de *Escherichia coli* mediante hibridación. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 19(4):193-196.
- Atencio-Bracho**, L., M. Salas-Bracho, E. Narváez, J. Suárez y J. Guiñez-Ortega. (2003). Incidencia y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* en individuos sanos y enfermos en Maracaibo-Venezuela. *Bol. Cto. Invest. Biol.* 37(2):1-14.
- Baker-Austin**, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *TRENDS Microbiol.* 14(4):176-182.
- Bean**, D.C., Livermore, D.M., Hall, L.M. (2009). Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(3):1088-93.
- Benavides-Plascencia**, L., Aldama-Ojeda, A.L., Vázquez, H.J. (2005). Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Pública Mex.* 47:219-226.
- Bennett**, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal Pharmacol.* 153:347-357.
- Boerlin**, P., Travis R., Gyles C.L., Reid-Smith R., Janeko N., Lim H., Nicholson V., McEwen S.A., Friendship R., Archambault M. (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *A. Environ. Microbiol.* 71(11):6753-6761.
- Brook**, G.F., Bute, J.S., Morse, S.A. (2003). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 16ª Edición. Manual Moderno.
- Bruinsma**, N., Filius, P.M.G., van de Bogaard, A.E., Nys, S., Degener, J., Endtz, E. Ph., Stobbering, E.E. (2003). Hospitalization, a risk factor for antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the community? *J. Antimicrob. Chemother.* 51:1029-1032.
- Cabrera**, R., Ruiz, J., Marco, F., Oliveira, I., Arroyo, M., Aladueña, A., Usera, M.A., Jiménez de Anta, M.T., Gascón, J., Vila, J. (2004). Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveller's diarrhea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(10):3934-3939.
- Carreras-Villaseñor**, N. (2004). Identificación genético molecular de patotipos de *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura.
- Cervantes**, C. (2006). Expulsión de metales pesados en bacterias. 35º Congreso Nacional de Microbiología. Oaxtepec Mor., México. 88.
- Cervantes**, C., Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J.F., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Latin. Microbiol.* 48(2): 203-210.
- Chang**, C.Y., Chang, L.L., Chang, Y.H., Lee, T.M., Chang, S.F. (2000). Characterization of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan, ROC. *J. Med. Microbiol.* 49: 1097-1102.
- Chaoudury**, P., Kumar, P. (1996). Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of enteropathogenic organisms isolated from coastal region of deltaic Sunderbans. *Indian J. Med. Res.* 104: 148-51.
- Clark**, C.A., Purins, L., Kaewrakon, Focareta, T., Maning, P.A. (2000). The *Vibrio cholera* O1 chromosomal integron. *Microbiology.* 146:2605-2612.
- Cooksey**, D.A., Azad, H.R., Cha, J.S., Lim, C.K. (1990). Copper resistance gene homolog in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Appl. Environ Microbiol.* 56(2): 431-435.
- Coombs**, J.M., Barkay, T. (2004). Molecular Evidence for the Evolution of Metal Homeostasis Genes by Lateral Gene Transfer in Bacteria from the Deep Terrestrial Subsurface. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3):1698-1707.

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

- Coria-Lorenzo**, J.J., Villalpando-Carrión, S., Gómez-Barreto, D., Treviño-Mateos, A. (2001). Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. *Rev. Mex Pediatr.* 68(5):200-215.
- Correa-Basurto**, A., Núñez-Cardona, M.T., Peña-Betancourt, S.D. (2007). Bacterias heterótrofas aisladas del lago de los Reyes Aztecas (Tlahuac) y su resistencia a diferentes antibióticos. *Rev. Latin. Rec. Nat.* 3: 84-89.
- Dang**, H., Ren, J., Song, L., Sun, S., An L. (2008). Diverse tetracycline resistant bacteria and resistance genes from coastal waters of Jiaozhou Bay. *Microb. Ecol.* 55:237-246.
- Espirito Santo**, C., Taudte N., Nies D. H., and Grass G. 2008. Contribution of Copper Ion Resistance to Survival of *Escherichia coli* on Metallic Copper Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(4):977-986.
- Gedek** N. (1981). En: *Antibióticoterapia*. Bayer Saúde Animal. Informe Técnico Nos. 1-9. Sao Paulo, 1996.
- Grape**, M., Sundstrom, L., Kronvall, G. (2003). Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 1022-1024.
- Gupta**, A., Phung, L.T., Taylor, D.E., Silver, S. (2001). Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. *Microbiol.* 147: 3393-3402.
- Guzmán Martínez**, J.J. (2007). Resistencia a metales y vancomicina en aislados clínicos de *Escherichia coli* diarreagénica y su relación con la fuente de carbono. Tesis de maestría.
- Hall**, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41: 95-98.
- Hammerum** A.M., Sandvang D., Andersen S.R., Seyfarth A.M., Porsbo L.J., Frimodt-Møller N., Heuer O.E. (2006). Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *Int J Food Microbiol.* 106(2):235-7.
- Harris**, E. (1998). *A low-cost approach to PCR: appropriate transfer of biomolecular techniques*. Oxford University Press.
- Hartman**, A.B., Essiet, I.I., Isenbarger, D.W., Linder, L.E. (2003). Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. An enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of *tet(A)-1*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1023-1032.
- Henriques**, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia A. (2008) Tetracycline-resistance genes in gram-negative isolates from estuarine waters. *Lett. Appl. Microbiol.* 47(6):526-533.
- Hentges**, D.J., (1993). The anaerobic microflora of the human body. *Clin. Infect Dis.* 16(4): 175.
- Herrera**, C.J.M.M (1999). The use of 16S ribosomal RNA analyses of the bacteriological phylogeny. *J. General Microbiol.* 126: 1215-1222.
- Hoyle**, D.V., Yates, C.M. Chase-Topping, M.E., Turner, E.J., Davies, S.E., Low, J.Ch., Gunn, Woolhouse, G.J., M.E.J., Amyes, S.G.B. (2005). Molecular epidemiology of antimicrobial-resistant commensal *Escherichia coli* strains in a cohort of newborn calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11): 6680-6688.
- Huysman**, M.W., Sauer, P.J. (1994). The vitamin K controversy. *Curr Opin Pediatr.* 6(2): 129-134.
- Ilender**. (2000). Notas científicas núm. 1. La lucha infecciosa: resistencia a los antimicrobianos. Informe anual regional de los países participantes en la red del monitoreo/ vigilancia de la resistencia a los antibióticos.
- Janda**, J.M., Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for Bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, Perils, and pitfalls. *J. Clin Microbiol.* 45 (9): 2761-2764.
- Karami**, N.F., Nowrouzian, I., Adlerberth Wold, A.E. (2006) Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(1):156-161.
- Kazmierczak**, K.A., Flint, H.J, Scott, K.P. (2006). Comparative analysis of sequences flanking *tet(W)* resistance genes in multiple species of gut bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(8):2632-2639.
- Kazmierczak**, K.A., Rincon, M.T., Pattersonm A.J., Martin J.C., Young, P., Flint, H.J., Scott, K.P. (2008). A new tetracycline efflux gene, *tet(40)*, is located in tandem with *tet(O/32/O)* in a human gut firmicute bacterium and in metagenomic library clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(11):4001-4009.

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

- Klingler**, J.M., Stowe, R.P., Obenhuber, D.C., Groves, T.O., Mishra, S.K., Pierson, D.L. (1992). Evaluation of the BIOLOG automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2089-2092.
- Koneman**, E.W., Stephen, D.A., William, M.J., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. (2003). Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana.
- Koonin**, E.V., Makarova, K.S., Aravind, L. (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:709-742. Review.
- Kumar**, S., Tamuta, K., Nei, M. (2004). MEGA4: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.* 5: 150-163. Laboratorio de Nacional Epidemiológico. LNR.
- Lane**, D., Pace, B., Olsen, G., Stahl, D., Sogin, M., Pace, N. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA.* 82: 6955-6959.
- Lazar**, V., Cernat, R., Bolotescu, C., Cotar, A., Coipan, E., Cojocar, C. (2002.) Correlation between multiple antibiotic resistance and heavy-metal tolerance among some *E. coli* strains isolated from polluted waters. *Bacteriol. Virusol Parasitol. Epidemiol.* 47 (34): 15-160.
- Leverstein-van Hall**, M.A., Paauw, A.A., Box, T.A., Blok, H.E.M., Verhoef, J., Fluit, A.C. (2002). Presence of Integron-Associated Resistance in the Community Is Widespread and Contributes to Multidrug Resistance in the Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3038-3040.
- Levesque**, C., Piche L., Larose C., Roy P.H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(1): 185-191.
- Levy**, B.S., Marshal, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Medicine.* 10(12):122-129.
- Macia**, M.D., Juan, C., Oliver, a., Hidalgo, O., Pérez, J.L. (2005). Molecular characterization of a glycopeptide resistant *Enterococcus faecalis* outbreak in an intensive care unit. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23 (8): 460-463.
- Macomber** L., Rensing C., Imlay J.A. (2007). Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J. Bacteriology.* 189(5):1616–1626.
- Marti** S., Fernandez-Cuenca F., Pascual A., Ribera A., Rodriguez-Bano J., Bou G., Miguel C., Pachon J., Martinez-Martinez L., Vila J. (2006). Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24(2):77-80.
- Martínez Alvarez** N. (2007). Virulencia, Resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Dpto Biol. Func. Tesis de Doctorado.
- Maslow**, J.N., Mulligan, M.E., Arbeid, R.D. (1993). Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect Dis.* 17(2): 153-162.
- Mata**, S.J., Cisneros, V.M.E., García, S.O. Cervantes, C. (2007). Aislamiento y caracterización de bacterias presentes en jales de minas de la comunidad de Santa Bárbara, Chihuahua, México.
- Mclever**, C.J., White, P.A., Jones, L.A., Karagiannis, T., Harkness, J., Marriott, D., Rawlison, W.D. (2002). Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype G carrying integrons. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1538-1540.
- Mojica Hernández** M.F. (2006). Sensibilidad a antibióticos y metales pesados en aislados clínicos de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura.
- Mondaca**, M.A., Echeverría V., Montoya, R., Bunster, M., Cid, H. (1993). Characterization of a plasmid codifying the synthesis of a beta-lactamase produced by *Shigella flexneri*. *Microbios.* 76(308): 161-166.
- Moraga**, R., Merino, C., Mondaca, M.A. (2003). Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Invest. Mar.* 31(1): 91-95.
- Nataro**, J.P., Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
- Naum**, M., Brown E.W., Mason-Gamer, R.J. (2008). Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the Enterobacteriaceae? *J. Mol. Evol.* 66: 630-642.
- Navarro-Risueño**, F., Miró, C.E., Mirelis, O.B. (2002). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20(5): 225-234.
- Nield**, B.S., Holmes, A.J., Gillings, M.R., Recchia, G.D., Mabbutt, B.C., Nevalainen, K.M., Stokes, H.W. (2001). Recovery of new integrons classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:59-65.

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

- Nies**, D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 313-339.
- Noyce**, J. O., Michels H., Keevil C. W. (2006). Use of Copper Cast Alloys to Control *Escherichia coli* O157 Cross-Contamination during Food Processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(6): 4239–4244.
- Nys**, S., Okeke, I.N., Kariuri, S., Dinant, G.J., Driessen, C., Stobberingh, E.E. (2004). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* from healthy volunteers from eight developing countries. *J. Antimicrob Chemother.* 54:952-955.
- O'Hara**, C.M. (2005). Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic Gram-negative bacilli. *Clin Microbiol Reviews.* 18(1):147-162.
- Pace**, N. (1996). New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News.* 62(9): 463-470.
- Peña**, MM, Lee J, Thiele DJ. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 129 (7):1251-60
- Pérez-Trallero**, E., I. Iglesias, 2003. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(9): 520-529.
- Perreten**, V., Boerlin P. (2003). New Sulfonamide Resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland Antimicrob. Agents Chemother. 47 (2):1169-1172.
- Pimentel**, B.E., Moreno-Sánchez, R, Cervantes, C. (2002). Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the ChrA proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 212: 249-254.
- Rechia**, G.D., Hall, R.M. (1995). Gene cassettes: A new class of mobile elements. *Microbiology.* 141: 3015-3027.
- Rensing** C., Ghosh M., Rosen B. P. (1999). Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases. Minireview. *Journal Bacteriol.* 181:19. 5891-5897.
- Rensing**, C, Grass G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev.* 27(2-3):197-213.
- Rensing**, C., Fan, B., Sharma,R., Mitra, B., Rosen, B.P. (2000). CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *PNAS.* 97(2), 652-656.
- Roberts**, M.C. (2002). Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes, *Mol. Biotech.* 20: 261-283.
- Roberts**, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. (2005). *FEMS Microbiol. Lett.* 245:195-203.
- Roberts**, M.C. (1997). Genetic mobility and distribution of tetracycline resistance determinants. *Ciba Found Symp.* 207: 206-222.
- Rodas**, C., Halvorsen, K., Iñiguez V. (2005). Multiresistencia antimicrobiana asociada a integrones en enteropatógenos de la diarrea infantil y *Escherichia coli* de la flora normal en niños menores de 5 años en la ciudad de La Paz. 50(2).
- Rodicio**, M.R., Mendoza, M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(4): 238-245.
- Rodríguez-Angeles**, G. (2006). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México.* 44:464-475.
- Rosales-Castillo**, J.A. (2004). Tipificación polifásica de aislados clínicos de *Escherichia coli* diarreagénica. Tesis de Licenciatura.
- Rosales-Castillo**, J.A. (2007). Diversidad genética y metabólica de aislados clínicos de *Escherichia coli*. Tesis de Maestría.
- Rosen**, B.P. (2002). Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 133(3):689-93.
- Rosser**, S.J., Young, H.K. (1999). Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from aquatic environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:11-18.
- Rowe-Magnus**, D.A., Guerout, A.M., Mazel, D. (1999). Super integrons. *Res. Microbiol.* 150:641-651.
- Sabat**, G., Rose, P., Hickey, W.J., Harkin, J.M. (2000). Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2): 844-849.

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

- Sabaté, M., Navarro, F., Miró, E., Campoy, S., Mirelis, B., Barbé, J., Prats, (2002).** Novel complex *sul1* type integron in *E. coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2656-2661.
- Sabaté, M., Prats, G. (2002).** Structure and function of integrons. *Enferm Infecc. Microbiol. Clin.* 20: 341-345.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C. (2004).** Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(10): 3996-4001.
- Saier, M.H., Jr. (2003).** Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol. Microbiol.* 48: 1145-1156.
- Sambrook, J., Russell D.W., Irwin N. Y Janssen K.A. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor, USA.
- Sánchez, P., Alonso, A., Martínez, J.L., (1998).** Inhibición de los mecanismos de permeabilidad y bombeo. *Rev. Esp. Químico.* 12(2): 1-4.
- Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson, Y., Miller, R.A. (2005).** Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild- animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1394-1404.
- Seral, C., Castillo, F.J., Rubio-Calvo, M.C. C. García y R. Gómez-Luz. (2001).** Asociación de los genes de resistencia a antibióticos MLS y a tetraciclina en *Streptococcus pneumoniae*®, *Rev. Esp. Químico.* 14:1.
- Shaw, D.R., Cabelli, V.J. (1980).** R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and fecal strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 40(4): 756-764.
- Shooter, R.A., y col., (1977).** *E. coli* serotypes in the faeces of healthy adults over a period of several months. *J. Hyg. L.* (78): 95.
- Silver, S, Misra TK, Laddaga RA. (1989).** DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances. *Biol Trace Elem Res.* 21:145-63.
- Silver, S, Phung LT (1996).** Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol.*;50:753-89.
- Silver, S., Ji, G. (1992).** Reduction of arsenate to arsenite by the *ArsC* protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 9474-9478.
- Silver, S., Phung, L.T. (2005).** A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 587-605.
- Simon, G.L., Gorbach, S.L. (1982).** Intestinal microflora. *Med. Clin. North Am.* 66. 95.
- Smets, B.F., Morrow, J.B., Arango-Pinedo, C. (2003).** Plasmid introduction in metal-stressed, subsurface-derived microcosms: plasmid fate and community response. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7): 4087-4097.
- Solioz, M.A., Odermatt, A., Krapf, R. (1994).** Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS Lett.* 346: 44-47.
- Soll, D.R., Lockhart, S.R., Pujol, C. (2003).** Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. *Manual of Clinical Microbiology.* 8ª Edición. Washintong, D.C. American Society Microbiol. 139-161.
- Solórzano-Santos, F., Miranda-Navales, M.G. (1998).** Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud pública Mex.* 40(6): 228-236.
- Soto, S.M., Cruz, M., Mendoza, M.C. (2003).** Distinctive human and swine strains of *Salmonella enterica* serotype Wien carry large self transferable R-plasmids. A plasmid contains a class 1-*qacEΔ1-sul1* integron with the *dfrA1-aadA1a* cassette configuration. *Food Microbiol.* 20: 9-16.
- Souza, V., Rocha, M., Sander, L., Eguiarte, L.E. (2001).** Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*. En: *Microbios en línea.* E. Martínez Romero y J. Martínez Romero (eds). Libro virtual editado por UNAM. ISBN: 968-36-8879-9. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/> pp. 69-89.
- Stackerbrandt, E., Goebel, B.M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Sun Yu, H., Chul Lee J., Young Kang, H., Sook Jeong, Y., Young Lee, E., Hee Choi, C., Ho Tae, S., Chul Lee, Y., Yong Seol, S, Taek Cho, D. (2003).** Prevalence of *dfr* genes dissemination of *dfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 445-450.

“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y A METALES EN AISLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIAS”

- Tang** Yi-Wei, Ellis N. M., M. K. Hopkins, Smith D. H., Dodge D. E., and Persing D. H. (1998) Comparison of Phenotypic and Genotypic Techniques for Identification of Unusual Aerobic Pathogenic Gram-Negative Bacilli J. Clin. Microbiol 36(12):3674–3679.
- Thompson**, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 24: 4876-4882.
- Tornieporth**, N.G., John, J., Salgado, K., de Jesus, P., Latham, E., Melo, M.C.N., Gunzburg, S.T., Ryley, L.W. (1995). Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* Strains in brazilian children by PCR. J. Clin Microbiol. 33(5):1371-1374.
- Torres**, A.G., Zhou, X., Kaper, J.B. (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. Infect Immun. 73(1): 18-29.
- Wang**, G., Wittham, T.S., Berg, C.M., Berg, D.E. (1993). RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. Nucleic Acids Res. 21: 5930-5933.
- White**, P.A., Mclver C.J., Deng, Y., Rawlinson, W.D. (2000). Characterization of two new gene cassettes, aadA5 and dfrA17. FEMS Microbiol Lett. 182(2):265-269.
- White**, P.A., Mclver, C.J., Rawlinson, W.D. (2001). Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. Antimicrobial Agents Chem. 45(9): 2658-2661.
- Yamaguchi**, A. (1997). Bacterial resistance mechanisms for tetracyclines. Nippon Rinsho. 55(5): 526-533.
- Yamamoto**, K, Ishihama A. (2005). Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. Mol Microbiol. 56(1):215-27.
- Yang**, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., Meng, J. (2004). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J. Clin. Microbiol. 42(8): 3483-3489.
- Yu**, H.S., Lee J.C., Kang H.Y., Ro D.W., Chung J.Y., Jeong Y.S., Tae S.H., Choi C.H., Lee E.Y., Seol S.Y., Lee Y.C., Cho D.T. (2003). Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. J Clin Microbiol. 41: 5429 5433.
- Zhang**, H., Shi, L., Li, L., Guo, S., Zhang, X., Yamazaki, S., Miyoshi, S., Shinoda, S. (2004). Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. Microbiol Immunol. 48:639-645.