



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE CASOS CLÍNICOS
EN CABALLOS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA
LEONARDO DANIEL VILLAVICENCO MONROY

Asesores:
M. en C. SALVADOR EDUARDO ACEVEDO MONROY
Dr. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
M. en C. INDA MARCELA FIGUEROA OCHOA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la fortaleza para enfrentar los retos que he tenido a lo largo de mi vida.

A mi abuela Amelia López Pérez (la mami) Q.E.P.D. Quien fue como mi segunda madre, estuvo conmigo en muchos momentos importantes de mi vida, me brindó todo su cariño y sobre todo la educación para ser una buena persona.

A mi madre María Martha Monroy López que trabajó muy duro para poder brindarme una educación, me apoyó incondicionalmente para estudiar esta profesión y a pesar de que muchas veces la economía era limitada, siempre vio la manera de sacarme adelante, este logro es tuyo también.

A mi hermano Adolfo Villavicencio, que aunque nunca se lo he dicho, su inteligencia me inspiraba a ser mejor siempre, me ha brindado sus conocimientos y apoyó a mi mamá para que pudiera seguir adelante con mis estudios.

A mis tías Lourdes Monroy y Guadalupe Monroy, mis segundas madres, siempre me vieron como un hijo y me brindaron su apoyo, cariño y consejos para ser una persona de bien.

A mis primos y primas, Nayi, Lupita, Miguel, Gerardo, Luis, Jorge, Christian, Ale, Melida, quienes también me apoyaron a lo largo de la carrera y que también los veía como un ejemplo de superación.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, la FMVZ, el Departamento de Microbiología e Inmunología y al Laboratorio de Microbiología Molecular en donde pude formarme profesionalmente y me brindaron la oportunidad de poder desarrollar este proyecto tan impórtate.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí para poder desempeñar este proyecto.

A la Dra. Marcel Figueroa por confiar en mí, me brindó su apoyo en todo momento tanto personal como profesionalmente.

A Salvador Acevedo quien fue parte fundamental de este proyecto, me transmitió sus conocimientos, su apoyo en todo momento y su amistad.

A la Dra. Grisel Anaya por permitirme formarme como docente, me ofreció su apoyo y consejos.

A la Dra. María Antonieta Mojica por permitirme ser parte de su equipo, por su ayuda proporcionándome cepas para buscar mis controles, por sus consejos y las risas en al el laboratorio.

A la Dra. Cristina Rodríguez y Brenda del laboratorio de Diagnostico bacteriológico que me apoyaron proporcionándome cepas paras mis controles.

Al Dr. Carlos Eslava y el Dr. Ulises Hernández de la unidad de Hemato Oncología e investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez; UNAM donde tuve oportunidad de poder finalizar mi proyecto.

A los integrantes del laboratorio de Microbiología Molecular y Vacunología, el Dr. Basurto, Castañeda, Lázaro, Ninet, Julio, Cloe, Rodrigo, Saúl, Isaac, Fernanda, Dalia, Andrea, Carlitos, Jocelyn, Adolfo, Víctor, Silvia, Maryol por su apoyo y consejos durante este proyecto.

A mis madrinas y padrinos, Araceli, Elena, Socorro, Rosa, Octavio y Miguel, personas con sabiduría, me brindaban consejos y estuvieron en momentos muy importantes de mi vida.

A mis amigos y amigas de la Facultad, Diana, Luisa, Mariana, Gaby, Fer, Lulú, Abby, Abril, Anahi, Jesy, Carolina, Krez, Ricardo, Alam, Oscar, personas muy inteligentes y ahora, mucho de ellos profesionales y que me han apoyado en este proceso tan importante.

A mis amigos, Mariana, Sara Edith, Liliana, Gil, Memo, Kenia, Beto, que son parte importante de mi crecimiento, han estado conmigo en momentos importantes, me han levantado cuando creía que no podía y de quienes siempre valoro sus consejos.

CONTENIDO

Resumen

1. Introducción.....	2
1.1 Enterobacterias.....	2
1.2 Empleo de antibióticos.....	3
1.2.1 Mecanismo de acción de los antibióticos.....	3
1.2.1.1 Inhibición de la síntesis de pared celular bacteriana.....	4
1.2.1.2 Inhibición de la síntesis de la membrana celular.....	4
1.2.1.3 Inhibición de la síntesis proteica.....	4
1.2.1.4 Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.....	5
1.3 Resistencia a antimicrobianos.....	6
1.3.1 Conjugación.....	7
1.3.2 Transformación.....	8
1.3.3 Transducción.....	8
1.4 Mecanismos de resistencia.....	9
1.4.1 Permeabilidad reducida.....	10
1.4.2 Bombas de expulsión.....	10
1.4.3 Inactivación enzimática.....	11
1.4.4 Alteración química del antibiótico.....	12
1.4.5 Alteración del sitio diana.....	14
1.4.6 Protección de la diana.....	15
1.5 Métodos para la detección de la resistencia antimicrobiana en bacterias.....	17
1.6 Epidemiología.....	20
1.7 Antecedentes del trabajo.....	22
2. Justificación.....	24
3. Hipótesis.....	25
4. Objetivo General.....	26
4.1 Objetivos específicos.....	26
5. Material y métodos.....	27

5.1 Cepas y medios de cultivo.....	27
5.2 Pruebas de difusión o antibiograma.....	28
5.3 Extracción de ADN.....	28
5.4 Extracción de plásmido.....	31
5.5 Estandarización de la PCR punto final.....	31
6. Resultados.....	34
6.1 Aislamientos.....	34
6.2 Susceptibilidad a quimioterapéuticos mediante la técnica de difusión en agar o antibiograma.....	35
6.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	38
6.4 Geles de agarosa.....	39
6.5 Comparación de la expresión fenotípica y genotípica.....	43
7. Discusión.....	45
8. Conclusiones.....	63
9. Referencias.....	64
10. Apéndice.....	80
10.1 Abreviaturas.....	80
10.2 Lista de figuras.....	81
10.3 Lista de cuadros.....	82
Anexo 1. Medios de cultivo.....	83
Anexo 2. Soluciones.....	88

RESUMEN

VILLAVICENCIO MONROY LEONARDO DANIEL. Detección genotípica y fenotípica de resistencia a antimicrobianos en enterobacterias aisladas de casos clínicos en caballos (bajo la dirección de: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, M. en C. Salvador Eduardo Acevedo Monroy y M. en C. Inda Marcela Figueroa Ochoa). La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo amplio de microorganismos, a nivel mundial, las enfermedades ocasionadas por estos géneros bacterianos, constituyen un problema grave para la salud pública. La terapia con antibióticos en caballos, no es práctica la administración de muchos medicamentos debido a factores como reacciones adversas, costos debido al tamaño del animal, entre otros factores, por lo que las opciones terapéuticas se reducen, dado un panorama complicado para; el paciente, clínico y responsable del animal. La resistencia a antimicrobianos (RAM) surge cuando los microorganismos que causan infección sobreviven a la exposición de un antimicrobiano y esto se ha convertido en un problema grave en salud pública y animal. Por otro lado en nuestro país existen pocos datos acerca de la detección de diversos genes asociados a resistencia antimicrobiana y la prevalencia de los mismos, por lo que este estudio proporciona información útil y pionera, para tener una perspectiva sobre la problemática de la RAM en nuestro país, no solo para determinar los mecanismos involucrados, sino también para conocer la epidemiología de los genes de resistencia detectados con mayor frecuencia. En este trabajo se realizó una comparación del perfil fenotípico obtenido mediante la técnica de difusión en disco y genotípico mediante la detección de genes de resistencia por la técnica de PCR en 33 aislamientos de enterobacterias y de esta manera asociar si la resistencia presentada en el antibiograma correspondía con que la cepa presentara alguno de los genes detectados. En su mayoría había una asociación de la resistencia observada en el perfil fenotípico y que presentaba un gen de resistencia que le podía conferir esta capacidad. Sin embargo, se observaron casos donde presentaban algún gen, pero eran susceptibles en el antibiograma. Finalmente se observaron casos, donde se menciona que géneros bacterianos presentan genes de resistencia de forma natural fueron susceptibles en el antibiograma a antibióticos sobre los que tendrían efecto esos genes.

1. Introducción

1.1 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* forma parte del dominio Bacteria, phylum: Gracilicutes; clase: Gamaproteobacteria; y orden: Enterobacteriales. Son bacterias Gram negativas, anaerobios facultativas, la mayoría son móviles por flagelos peritricos. Son bacilos y constituyen un grupo amplio de microorganismos cuyo reservorio natural es el tracto gastrointestinal (aunque no exclusivamente) de animales y el hombre. Son fermentadoras de la glucosa y de otros hidratos de carbono, la mayoría carecen de citocromo oxidasa excepto *Plesiomonas Shigelloides*.¹ La familia Enterobacteriaceae se compone de más de 30 géneros y 120 especies. En el cuadro se presentan los géneros de mayor relevancia en medicina veterinaria.² (Cuadro 1)^{1,2}

Género	Especie
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> <i>oxytoca</i> <i>aerogenes</i>
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i> <i>vulgaris</i>
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> <i>bongori</i>
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i> <i>pestis</i> <i>pseudotuberculosis</i>

Cuadro 1 Géneros bacterianos de mayor relevancia en medicina veterinaria.

A nivel mundial, las enfermedades ocasionadas por estos géneros bacterianos, constituyen un problema grave para la salud pública, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en países en vías de desarrollo, causando enfermedades gastrointestinales con presentación de diarreas y toxemia o afecciones como: septicemias, nefritis, artritis, neumonías, abscesos, endometritis y abortos.^{3,4} En el tratamiento rutinario, usualmente se prescriben antibióticos, sin embargo, el uso de estos debe estar basado en principios racionales que incluyan una evaluación cuidadosa del paciente, juicio clínico, información del agente o agentes infectantes (incluyendo sus resistencias intrínsecas) selección del medicamento adecuado, formulación de un régimen de dosis adecuado al paciente y conciencia de los beneficios y riesgos de la terapia aplicada.⁵

1.2 Empleo de antibióticos

Dentro de la práctica clínica, cuando se presentan enfermedades en animales como diarreas, sepsis, neumonías, u otros datos de infecciones asociadas a enterobacterias, generalmente el médico veterinario utiliza antimicrobianos, basándose en un criterio construido con base en el conocimiento de los fármacos aplicables al problema infeccioso en cuestión y su gravedad, posología, farmacodinamia, farmacocinética, vía de administración, costo, disponibilidad en el área geográfica y disposición del propietario. La terapia con estos fármacos puede detener el crecimiento bacteriano o causar la muerte, dependiendo de su mecanismo de acción y de la concentración que alcance el fármaco en el sitio de la infección. Si el agente etiológico es sensible al fármaco de elección, el cuadro clínico se resuelve sin complicaciones. Sin embargo, este podría ser ineficiente y podría promover el fenómeno de selección de mutantes resistentes, a pesar de que el microorganismo sea susceptible a la acción del antimicrobiano, por una aplicación incorrecta, subdosificación o un periodo corto de tratamiento.^{6, 7, 8,9}

1.2.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

El descubrimiento y la posterior producción a gran escala de los antimicrobianos a principios del siglo XX fue uno de los logros más importantes en la historia de la

medicina.¹⁰ Los antimicrobianos actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos esenciales para las bacterias, la especificidad de acción depende de que el fármaco bloquee una enzima u otro sustrato que no esté presente en las células eucariotas o sea suficientemente distinto.^{10, 11}

1.2.1.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana.

Las bacterias poseen una pared celular constituida por una estructura glucopéptida denominada peptidoglucano o mureína, el cual es un componente vital que les proporciona estabilidad mecánica. Está compuesto por cadenas de N-acetilglucosamina y de N-acetilmurámico. Los betalactámicos, dentro de los que se incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, inhiben el último paso de la síntesis del peptidoglucano, los receptores de estos antimicrobianos se conocen como proteínas de unión a penicilina (PBP).^{10,12}

1.2.1.2 Inhibición de la síntesis de la membrana celular

Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa, la lámina interna de esta membrana está constituida por fosfolípidos, mientras que la externa contiene un lípido glucosilado denominado lipopolisacárido (LPS) o endotoxina, además de estar provistas de una capa fina de peptidoglucano.¹³ Varios derivados de naturaleza lipopeptídica como la polimixina B y la colistina (polimixina E) tienen la capacidad de insertarse en el LPS conduciendo a la muerte celular por atracción electrostática ejercida entre la carga positiva de los grupos amino y los aniones fosfato y carboxilo que componen la capa de LPS. El interés por esos antimicrobianos ha resurgido ya que a menudo son la única opción terapéutica contra cada vez más cepas multirresistentes.^{10, 13, 14}

1.2.1.3 Inhibición de síntesis proteica

Existen diversos antibióticos con la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas, esto lo hacen por medio de la unión a distintas regiones del ARN ribosomal (ARNr). En el ribosoma bacteriano, el centro de decodificación se encuentra en una pequeña región del ARN 16S de la subunidad 30S, mientras que el lugar de formación de enlace peptídico están contenidos en un bucle del dominio V del ARNr 23S de la subunidad 50S.^{13, 15} Los aminoglucósidos y tetraciclinas actúan inhibiendo síntesis de proteínas a nivel ribosomal 30S, mientras que macrólidos, lincosamidas,

fenícoles lo hacen a nivel ribosomal 50S. Por otro lado el ácido fusídico actúa uniéndose al factor de elongación G y estabiliza el complejo formado entre ese factor y el difosfato de guanosina, lo cual impide que el ARNt pueda desplazarse desde del centro de decodificación al centro de formación de enlaces peptídicos. Constituye otra excepción la mupirocina, un antibiótico de uso exclusivamente tópico inhibe la sintetasa de isoleucil-ARNt, lo que impide la incorporación de isoleucina a los péptidos en formación y determina el bloqueo de la síntesis proteica.^{10, 13, 15}

1.2.1.4 Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos

El ADN bacteriano se encuentra superenrollado y para que este se pueda replicar y transcribir es necesaria la actividad de enzimas que relajen su estructura superhelicoidal.¹⁰ Durante el proceso de replicación, la enzima Helicasa hidroliza los puentes de hidrógeno que unen la doble cadena de ADN. Para evitar la ruptura debida a la tensión generada por la aperturas de las cadenas nucleotídicas la topoisomerasa II (también llamada ADN girasa) se encarga de la relajación y la topoisomerasa IV de la separación de las moléculas hijas.¹³ Dentro de esta clasificación de mecanismo de acción se encuentran dos antimicrobianos clínicamente relevantes, las quinolonas que ejercen su acción bloqueando las topoisomerasas II y IV, y las rifamicinas que inhiben la síntesis de ARN ribosómico y mensajero al bloquear la subunidad beta de la ARN polimerasa.^{10, 13}

Por otro, lado las sulfonamidas y la trimetoprima interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos de manera diferente, las bacterias son incapaces de obtener ácido fólico del entorno y requieren sintetizarlo, estos fármacos inhiben esta síntesis, lo cual interfiere en última instancia con la producción de nucleótidos particularmente timina.¹⁵ Las sulfamidas son análogos estructurales del ácido paraminobenzoico y actúan como un falso sustrato de la dihidropteroato sintetasa, el cual se convierte en ácido dihidrofólico y este, a su vez, en el principio activo, el ácido tetrahidrofólico (ácido fólico) por la acción de la dihidrofolato reductasa, que es la enzima específicamente inhibida por la trimetoprima.^{10,15} La acción conjunta de sulfamidas y trimetoprima en las bacterias es sinérgica y resulta en una actividad bactericida.^{10, 13,15} En el cuadro 2 se muestran los principales grupos de antimicrobianos de interés

clínico de acuerdo a su mecanismo de acción y estructura química así como sus principales representantes.¹⁵

Mecanismo de acción	Grupos		Antimicrobianos representativos
Inhibición de la síntesis de pared bacteriana	β-lactámicos	Penicilinas	Naturales: penicilina G penicilina V
			Resistentes a penicilinasas: cloxacilina, oxacilina, meticilina
			Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina
			Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina
			Ureidopenicilinas: piperacilina, mezlocilina
	Cefalosporinas	1ª generación: cefazolina, cefalotina	
		2ª generación: cefuroxima, cefoxitina, cefactor, cefamadol	
		3ª generación: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima	
		4ª generación: cefepima, ceftipima	
Monobactams	Aztreonam		
Carbapenems	Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem		
	Bacitracina	Bacitracina	
	Fosfonopéptidos	Fosfomicina	
Alteración de la membrana citoplásmica	Polimixinas		Polimixina B, polimixina E (colistina)
	Lipopéptidos		Daptomicina
Inhibición de la síntesis de proteica	Aminoglucósidos		Gentamicina, amikacina, tobramicina
	Fenicoles		Cloranfenicol, florfenicol
	Lincosamidas		Clindamicina, lincosamida
	Macrólidos		14 átomos de carbono: eritromicina, claritromicina
			15 átomos de carbono: azitromicina
		16 átomos de carbono: espiramicina	
Tetraciclinas		Tetracilina, doxiciclina	
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Quinolonas		1ª generación: ácido nalidixico
			2ª generación: norfloxacina
			3ª generación: ciprofloxacina, levofloxacina
			4ª generación: moxifloxacina
	Rifamicina		Rifampicina
Nitromidazoles		Metronidazol	
Nitrofuranos		Nitrofurantoina	
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Sulfonamidas	Trimetoprima	Cotrimoxazol
	Diaminopirimidinas		Sulfametoxazol
Inhibidores de β-lactamasas			Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam

Cuadro 2 Grupos antimicrobianos y sus principales representantes tomado y modificado de: Calvo J, Martínez-Martínez L. 2009¹⁵

1.3 Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a antimicrobianos (RAM) surge cuando los microorganismos que causan infección sobreviven a la exposición de un fármaco que normalmente los mata o detiene su crecimiento.¹⁶ Esto permite a aquellas cepas que son capaces de sobrevivir a la exposición a dicha sustancia, crecer y propagarse. La RAM es un proceso natural que se ha observado desde que se comenzaron a utilizar los primeros antibióticos y, de hecho, los genes que confieren resistencia a estos medicamentos ya existían en algunas cepas bacterianas desde hace millones de

años.^{10,16} Sin embargo, la RAM se ha convertido en un problema grave en salud pública y animal, debido al uso indiscriminado de antimicrobianos, la selección de bacterias resistentes y la diseminación de esta resistencia por medio de elementos genéticos móviles.¹⁶ Además, conforme se han desarrollado nuevos quimioterapéuticos también se ha encontrado cepas resistentes a dichos fármacos y esta resistencia pueden ser intrínseca o adquirida por medio de elementos genéticos móviles.¹⁷

La resistencia intrínseca son todos aquellos eventos de defensa que se encuentran en las bacterias de forma natural; es un rasgo que se comparte universalmente dentro de una especie bacteriana, es independiente de la exposición previa a antibióticos y no está relacionada con la transferencia horizontal de genes.¹⁸ Los mecanismos documentados de resistencia intrínseca son: 1) Permeabilidad reducida: debido a la presencia de la membrana externa en bacterias Gram negativas la cual es impermeable a diversas moléculas y por otro lado la expresión de numerosas bombas de expulsión que reducen eficazmente la concentración intracelular del fármaco, 2) Inactivación del antibiótico (hidrolisis y modificación) y 3) Alteración del sitio diana por mutaciones o protección.^{17,18,19}

Por otro lado, la resistencia adquirida ocurre por medio de elementos genéticos móviles, que en el caso de bacterias pueden ser adquiridos por medio de plásmidos, ADN desnudo, bacteriófagos o transposones. Esta nueva adquisición de genes puede ser intracelular, como la transferencia de un gen de un plásmido al cromosoma bacteriano o intercelular que ocurre entre bacterias y resulta de la transferencia horizontal de genes.^{17, 19}

1.3.1 Conjugación

Es la transferencia de material genético entre bacterias por contacto directo mediante puentes de unión y conexión entre dos células. El material genético transferido puede ser un plásmido, un transposón, un integrón o una porción del cromosoma movilizada por un plásmido. En la conjugación, una célula donante transmite información genética a otra célula receptora. La célula donante posee una estructura en la superficie, denominada *pili* conjugativo, que se retrae,

posteriormente se forma el puente entre las dos bacterias; por este puente pasa el ADN de una de las células a la otra. Se ha demostrado experimentalmente que el círculo de ADN del plásmido se abre y una cadena sencilla de este, es transferida y posteriormente replicada en la célula receptora. Los plásmidos conjugativos se pueden diseminar rápidamente entre poblaciones bacterianas y esta característica los convierte en los principales elementos que intervienen en la transferencia de la resistencia bacteriana.^{20, 21}

1.3.2 Transformación

Es un proceso en el cual una molécula de ADN libre se incorpora a la bacteria receptora que se encuentra en estado competente y provoca un cambio genético. Después de la transformación puede ocurrir la recombinación entre los genes introducidos y los del cromosoma bacteriano. El estado de competencia se ve influido por el estadio de crecimiento, la concentración de ADN y la composición del medio. Es el mecanismo menos común de transferencia de resistencia.^{20, 22}

1.3.3 Transducción

Es la transferencia de ADN de una bacteria a otra mediante la participación de un bacteriófago. Algunos de estos tienen la capacidad de incorporar su ácido nucleico al cromosoma de la célula huésped, de forma que los genes virales se replican junto con el ADN bacteriano, tomando el nombre de profago, virus temperado o en estado lisogénico. La transducción puede ocurrir por ciclo lítico o ciclo lisogénico según el tipo de bacteriófago.^{20, 21} Las formas en las que se puede dar este mecanismo es: cuando un fago temperado (profago) porta genes bacterianos adquiridos durante un ciclo infeccioso anterior, y al infectar una nueva bacteria e integrar su genoma al cromosoma bacteriano, incorporará a éste la información genética correspondiente a la bacteria infectada previamente.^{20, 21}

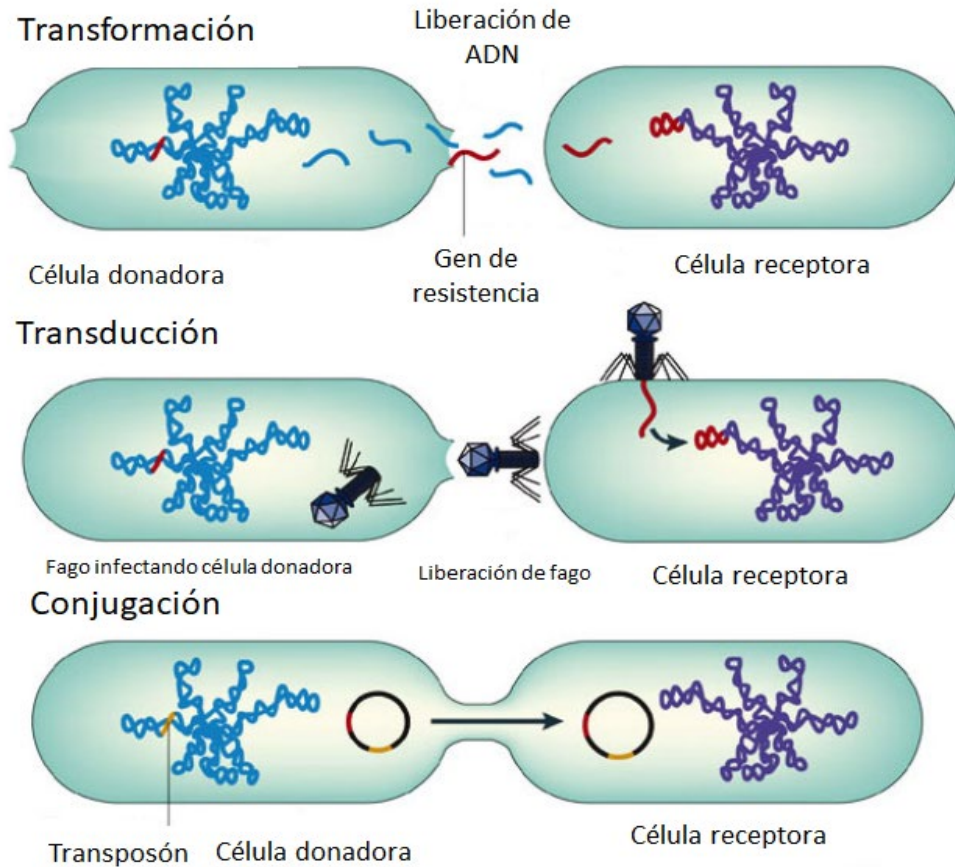


Figura 1: Procesos de transformación, transducción y conjugación. En el proceso de transformación el ADN libre, el cual posee genes de resistencia se incorpora a una bacteria receptora, provocando un cambio genético. La traducción es un mecanismo en el que el ADN se transfiere de una célula a otra mediante bacteriófagos, los cuales tienen la capacidad de incorporar ácidos nucleicos al cromosoma. Por ultimo está el proceso de conjugación en donde una célula donadora la cual posee un plásmido y por medio de un *pili* conjugativo transfiere este elemento genético a una bacteria receptora. Tomado y modificado de: ²³

1.4 Mecanismos de resistencia

La resistencia antimicrobiana es un problema continuo y en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie. Los fenómenos de resistencia antimicrobiana son variados e incluyen los siguientes: ²⁴

1.4.1 Permeabilidad reducida

Algunas bacterias han desarrollado mecanismos para evitar que el antibiótico alcance su objetivo intracelular o periplásmico al disminuir la captación de la molécula antimicrobiana. Este mecanismo es particularmente importante en bacterias Gram negativas. La membrana externa actúa como la primera línea de defensa contra la penetración de múltiples compuestos tóxicos, incluidos varios agentes antimicrobianos. Las moléculas hidrófilas como los beta lactámicos, las tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas se ven particularmente afectadas por los cambios en la permeabilidad de la membrana externa, ya que a menudo utilizan canales de difusión conocidos como porinas para cruzar esta barrera.²⁵ Se han descrito varios tipos de porinas y se pueden clasificar según su estructura, su selectividad y la regulación de su expresión. Entre las mejor caracterizadas, las tres proteínas principales producidas por *E.coli* (OmpA, OmpF, OmpC) son un ejemplo clásico de resistencia a antibióticos mediada por porinas. Las alteraciones de estas podrían lograrse mediante tres procesos generales: cambio en tipo de porina expresada, cambio en el nivel de expresión de la porina y deterioro de la función. Sin embargo, los cambios en la permeabilidad a través de cualquiera de estos mecanismos con frecuencia dan como resultado una resistencia de bajo nivel y a menudo se asocian con otros mecanismos de resistencia como una mayor expresión de bombas de expulsión.^{25,26}

1.4.2 Bombas de expulsión

Se describió por primera vez como un sistema de expulsión capaz de bombear tetraciclina fuera del citoplasma en *E. coli*, este es dado por una proteína llamada Tet. Numerosas clases de bombas de expulsión se han caracterizado sobre todo en patógenos. Hay cinco familias principales de bombas de expulsión.^{25, 27,28}

- La superfamilia de facilitadores principales (MFS)
- La pequeña familia de resistencia a múltiples fármacos (SMR)
- El casete de unión a ATP (ABC)
- El flujo de salida de múltiples fármacos de tamaño pequeño (MATE)

- La familia de resistencia-nodulación-división celular (RND) siendo esta la mayormente responsable de la resistencia intrínseca en Gram negativas

Estas familias difieren en términos de conformación estructural, fuente de energía, rango de sustratos que pueden expulsar y en el tipo de organismo bacterianos en los que se distribuye.^{25, 27,28}

1.4.3 Inactivación del antibiótico

El mecanismo principal de resistencia a los betalactámicos se basa en la destrucción de estos compuestos por la acción de la betalactamasas. Estas enzimas destruyen el enlace amida del anillo betalactámico, lo que hace que el antimicrobiano sea ineficaz, son especialmente importantes en bacterias Gram negativas. La propagación de los genes que codifican betalactamasas se ha agravado en gran medida por su integración en elementos genéticos móviles, como plásmidos o transposones que facilitan la rápida transferencia de material genético entre microorganismos.^{25, 29}

Las betalactamasas se clasifican utilizando esquemas basados en su función (el sistema de Bush-Jacoby-Medeiros) o estructura (clasificación de Ambler) pero en general son ampliamente separados en enzimas con un sitio activo de serina y aquellos que requieren un cofactor de iones metálicos. El esquema de clasificación de Ambler divide las betalactamasas en cuatro grupos: las enzimas de clase A, C y D son proteínas con un residuo de serina en sus sitios activos y las proteínas de clase B son metaloenzimas dependientes de zinc. Algunas proteínas de clase A funcionan como betalactamasas de espectro extendido y como carbapenemasas. Las metaloenzimas de clase B que hidrolizan los carbapenémicos son susceptibles a la inhibición por EDTA, mientras que no son susceptibles a la inhibición por el ácido clavulánico (un inhibidor de las betalactamasas). AmpC, una enzima inducible y generalmente cromosómica que se encuentra en muchas especies de enterobacterias es un prototipo de enzima de clase C. se han encontrado enzimas de clase D solo en algunas especies como *Pseudomonas aeruginosa*.³⁰

Entre los grupos funcionales, se encuentra el grupo 1, en el que se ubican las cefalosporinasas de clase molecular C, las cuales son activas contra las

cefalosporinas de tercera generación y cefamicinas, como el cefoxitima. Usualmente son resistentes a la acción inhibitoria del ácido clavulánico y del sulbactam, y poseen una gran afinidad frente al aztreonam. El grupo 2, o de clases moleculares A y D, incluye las serin-betalactamasas y múltiples subgrupos, de los cuales los de mayor importancia clínica son dos subgrupos de la clase A: las betalactamasas de espectro extendido, que hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro y antibióticos monobactámicos, y son inhibidas por el ácido clavulánico, y las serin-carbapenemasas, con capacidad de hidrolizar toda clase de betalactámicos. Las de clase D poseen propiedades de hidrólisis frente a los carbapenémicos. Por último, las betalactamasas que requieren de iones divalentes de zinc, se clasifican en el grupo 3 como metalo-betalactamasas de clase molecular B y se diferenciaron inicialmente por su habilidad para hidrolizar carbapenémicos, en contraste con su poca afinidad o capacidad hidrolítica frente a los monobactámicos; además, no son inhibidas por el ácido clavulánico o el tazobactam, pero sí por quelantes de iones de metal como el ácido etilen-diamino-tetraacético o EDTA.³¹

Otro ejemplo de este proceso son las estererasas. En la biosíntesis de macrólidos por policétido sintetasas, la aglicona del macrólido se convierte en una lactona cíclica, formando un enlace éster. Las estererasas hidrolizan este enlace éster, linealizando así el macrólido, y por lo tanto ya no puede unirse a su sitio de unión ribosomal. El producto exacto de la reacción catalizada por la estererasa no ha sido completamente identificado.³²

1.4.4 Alteración química del antibiótico

La producción de enzimas capaces de introducir cambios químicos en la molécula antimicrobiana es un mecanismo bien conocido de resistencia adquirida a los antibióticos en las bacterias. Las transferasas modifican covalentemente los antibióticos resultando en alteraciones estructurales que perjudican la unión a la diana. Las estrategias químicas incluyen: O-acilación y N-acilación, O-fosforilación, O-nucleotidilación, O-ribosilación, O-glicosilación y transferencia de tiol. Todas estas estrategias de modificación covalente requieren un co-sustrato para actividad, incluyendo ATP, acetilCoA, NAD⁺, glucosa UDP o glutatión. En consecuencia, estas

enzimas solo están activas en el citosol. Se han descrito muchos tipos de enzimas modificadoras y las reacciones bioquímicas más frecuentes que catalizan incluyen:
25,33

Acetiltransferasas: la modificación covalente de grupos hidroxilo y/o amina vulnerables en antibióticos da como resultado compuestos que pierden su capacidad para unirse al objetivo y, por tanto, quedar inactivos. El éster resultante (para O-acetilación) o amida (para N-acetilación) es biológicamente estable y, por tanto, esencialmente irreversible sin la acción de una esterasa análoga o enzima amidasa, por ejemplo, dentro de este grupo se encuentran las aminoglucósido acetil transferasas (AAC) que son miembros de la superfamilia GCN5 de proteínas que incluyen las histonas acetiltransferasas entre otros. Por otro lado tenemos a las cloranfenicol acetiltransferasas (CAT) son enzimas triméricas que tienen dos tipos estructurales distintos: clase A y clase B (también conocidas como CAT xenobióticos).^{33,34}

Fosfotransferasas: las quinasas son enzimas ubicuas que catalizan la transferencia del fosfato de un trinucleotido nucleósido, típicamente ATP, a un conjunto de sustratos. Las quinasas involucradas en la resistencia son O-fosfotransferasas. Las aminoglucósido quinasas, denominadas APH por aminoglucósido fosfotransferasas, están ampliamente distribuidas entre bacterias patógenas. Las APH se clasifican según su región de especificada de transferencia de fosforilo, su sustrato y la secuencia genética específica. La APH-IIIa, es la más estudiada y tiene la capacidad de transferencia de fosforilo a regiones específicas de 3' y 5'. Otras aminoglucósido quinasas incluyen StrA y StrB. Por otro lado las Mph están vinculadas a resistencia en *Escherichia coli*, la fosforilación ocurre en el hidroxilo libre del azúcar desosamina que interactúa directamente con el ARNr 23S.^{33, 35}

Nucleotidiltransferasas: hay dos clases principales de estas enzimas; los ANT que codifican los aminoglucósidos y las proteínas Lin que inactivan los antibióticos lincosamídicos, que incluyen lincomicina y su derivado semisintético derivado, la clindamicina. Estas enzimas transfieren la porción NTP a un grupo hidroxilo

aceptante en el antibiótico. Estas pueden ser transferasas AMP exclusivas *en vivo*. Las ANT representan la clase más pequeña de enzimas que inactivan aminoglucósidos, aunque tienen gran impacto en la resistencia clínica. La gentamicina y tobramicina se modifican por ANT (2'').^{33, 36}

Grupo Bush-Jacoby	Clase molecular Subclase	Substrato preferidos	Inhibidos		Principales Características	Enzimas representativas
			Ac. clavulánico	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	No	No	Mejor hidrólisis de cefalosporinas que de bencipenicilinas.	AmpC, P99, ACT-1, CYM-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis incrementada hasta ceftazidima y otros oximino-beta-lactámicos.	GC1, CMY-37
2b	A	Penicilina, cefalosporinas	Si	No	Hidrólisis similar de bencipenicilinas y cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Si	No	Hidrólisis incrementada hacia ceftazidima y otros oximino-beta-lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime).	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilina	No	No	Resistencia a ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam.	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	No	No	Hidrólisis incrementada hacia oximino-beta-lactámicos combinados con resistencia a AC, sulbactam y tazobactam.	TEM-50
2c	A	Carbenicilinas	Si	No	Hidrólisis aumentada de la carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce		Carbenicilinas, cefepime	Si	No	Hidrólisis aumentada de la carbenicilina, cefepime y cefpirome.	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis aumentada de la cloxacilina o de la oxacilina.	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	Hidrólisis de la cloxacilina u oxacilina y oximino-beta-lactámicos.	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenems	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina y carbapenems.	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibido por ácido clavulánico pero no por aztreonam.	CepA
2f	A	Carbapenems	Variable	No	Hidrólisis aumentada de carbapenems, oximino-beta-lactámicos, cefamicinas.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapenems	No	Si	Hidrólisis de espectro extendido incluyendo carbapenems, pero no monobactams	IMP-1, VIM-1, CrA, IND-1
	B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenems	No	Si	Hidrólisis preferente de carbapenems	CphA, Sfh-1

Cuadro 3. Clasificación de betalactamasas de acuerdo al esquema de Ambler y el de Bush-Jacoby-Medeiros.³⁷

1.4.5 Alteración del sitio diana

Introducir modificaciones en el sitio objetivo es uno de los mecanismos más comunes de resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos y afectan a casi

todas las familias de compuestos antimicrobianos. Estos cambios en el sitio diana pueden consistir en mutaciones puntuales en los genes que codifican el sitio diana como lo es en el desarrollo de mutaciones cromosómicas en los genes que codifican la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC*, *parE*).³⁸

Remplazo o desvío del sitio diana original. Con esta estrategia, las bacterias son capaces de desarrollar nuevos objetivos que cumplen funciones bioquímicas similares al objetivo original, pero no son inhibidos por la molécula antimicrobiana. Otra vía para evitar la acción antimicrobiana es aumentar la producción del objetivo antimicrobiano con la finalidad de abrumar al antibiótico aumentando la cantidad de objetivos disponibles. Un ejemplo relevante de este mecanismo es la resistencia a sulfametoxazol-trimetoprima con la sobreproducción de la dihidropteroato sintasa y la dihidrofolato reductasa a través de mutaciones en la región promotora del ADN que codifica estas enzimas.²⁵

Alteraciones enzimáticas del sitio de unión (por ejemplo, adición de grupos metilo) Uno de los ejemplos mejor caracterizados de resistencia a través de la modificación enzimática del sitio objetivo es la metilación del ribosoma catalizada por una enzima codificada por los genes *erm* (metilación del ribosoma de la eritromicina) que da como resultado resistencia a los macrólidos. Estas enzimas son capaces de mono o dimetilar un residuo de adenina en la posición A2058 del dominio V del 23ARNr de la subunidad ribosómica 50S y debido a este cambio bioquímico, se altera la unión de la molécula antimicrobiana a su objetivo.²⁵

1.4.6 Protección del sitio diana

Esto se lleva a cabo mediante la interacción proteína-proteína, en el que una proteína de resistencia a los antibióticos (proteína de protección diana) se une directamente a la proteína objetivo del fármaco y actúa para protegerla de los efectos inhibidores de un antibiótico. La protección del objetivo no implica un cambio permanente en la naturaleza del objetivo, en cambio, se requiere una interacción directa persistente o repetida entre la proteína de protección y el objetivo para efectuar la resistencia. La protección de la diana se reconoció por primera vez como

un mecanismo de resistencia a los antibióticos en el contexto de la resistencia a la tetraciclina hace aproximadamente 30 años.^{39, 40}

Aunque algunos de los determinantes genéticos que codifican proteínas que median la protección del sitio diana se han encontrado en el cromosoma bacteriano, la mayoría de los genes clínicamente relevantes involucrados en este mecanismo de resistencia son transportados por elementos genéticos móviles multirresistentes. Como por ejemplo *Qnr* en fluoroquinolonas que es un determinante de resistencia a fluoroquinolonas mediado por plásmidos que se encuentran con frecuencia en aislados clínicos. Se debe destacar que la presencia de proteínas *Qnr* confieren una resistencia a las quinolonas de bajo nivel. Sin embargo, se ha demostrado que albergar genes que codifican *Qnr* promueve la aparición de cepas altamente resistentes al facilitar la selección de mutantes con mutaciones puntuales en genes que codifican la ADN girasa y/o la topoisomerasa IV.²⁵

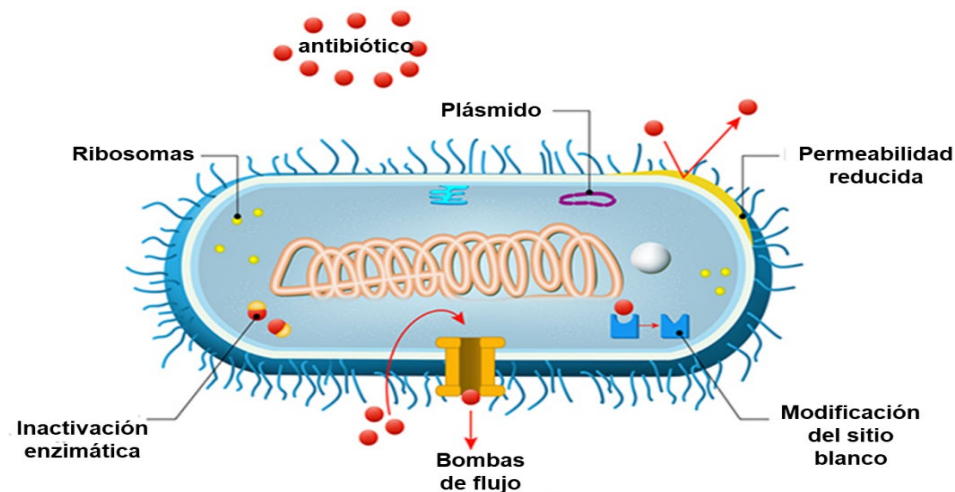


Figura 2: Mecanismos de resistencia antimicrobiana. Se observan los principales mecanismo por los cuales una bacteria puede evadir el efecto de un antimicrobiano como: permeabilidad reducida, este mecanismo es particularmente importante en bacterias Gram negativas, la membrana externa actúa como la primera línea de defensa contra la penetración de antimicrobianos. Bombas de flujo las cuales son transportadores capaces de expulsar antimicrobianos. Modificación del sitio blanco donde existen cambios en el sitio diana que pueden consistir en mutaciones impidiendo el efecto del antimicrobiano. Inactivación enzimática es decir de enzimas capaces de introducir cambios químicos en la molécula antimicrobiana impidiendo su efecto. Copiado y modificado de: ⁴¹

1.5 Métodos para la detección de resistencia antimicrobiana en bacterias.

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Se realiza mediante las pruebas de susceptibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. Para efectuar las pruebas de sensibilidad, se cuenta con diferentes métodos como: difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby), dilución en agar, macrodilución y microdilución en caldo, épsilon test (E-test) o métodos automatizados por mencionar algunos.⁴²

La técnica de difusión en agar o antibiograma es la técnica más utilizada y se define como la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Su resultado, la farmacología del antimicrobiano, en particular en el lugar de la infección, y los aspectos clínicos del paciente y de su infección, sustentan la elección de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. El panorama actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que la sensibilidad se considera universal y no se han descrito, por el momento, mecanismos de resistencia. Por el momento no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección y, por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad.⁴²

El principio de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado en los laboratorios de microbiología. Bauer, Kirby, Sherris y Turck⁴³ probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966, ellos publicaron su estudio describiendo la prueba que se usa en la actualidad. El Instituto de Estándares Clínicos y de

Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), adopto los pasos básicos del procedimiento descritos en el estudio de Bauer como el método de referencia para difusión por disco. Estos pasos deben de seguirse en forma minuciosa para obtener resultados precisos.⁴³

El antibiograma consiste en depositar, en la superficie de agar Müeller-Hinton en una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por ejemplo el método de dilución. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI.^{42, 43}

Con respecto a el empleo de métodos moleculares para detectar los mecanismos de resistencia, éstos se desarrollan mediante diferentes estrategias: 1) hibridación

ADN-ADN con una sonda de ADN marcada con fluorescencia; esta metodología consiste en la identificación de una secuencia específica de ADN (gen que codifica a una resistencia) mediante el reconocimiento de la secuencia homóloga en el ADN en varias muestras clínicas o bacterianas, 2) amplificación por PCR de un gen específico; esta técnica amplía en forma exponencial un gen específico de interés, 3) polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP), que se basa en el análisis del patrón de restricción de los fragmentos de ADN generados por una enzima de restricción que previamente se amplificaron por PCR; esta prueba puede detectar mutaciones puntuales en el ADN que alteren el número de sitios de restricción de la enzima empleada y 4) secuenciación nucleotídica de ADN, que consiste en la identificación de la secuencia de las cuatro bases que componen el ADN mediante una síntesis de ADN *in vitro*; esta secuencia puede utilizarse para inferir la secuencia de aminoácidos que componen a la proteína que codifica este ADN e identificar las posibles alteraciones (mutaciones) al compararse con el gen silvestre. Estas metodologías son muy útiles y se emplean en forma regular en laboratorios de biología molecular.⁴⁴

Sin embargo, se han desarrollado otras metodologías novedosas que aportan conocimientos nuevos al campo de la genómica y la proteómica. En el caso de la primera se han desarrollado metodologías que permiten determinar el número de copias de un gen en un genoma bacteriano, basado en PCR en tiempo real, “pirosecuenciación” (denominada así por la liberación de pirofosfato durante la reacción) y microarreglos del ADN empleado para obtener una pronta genotipificación de expresión de proteínas por ejemplo betalactamasas. Con respecto a la proteómica, se ha utilizado la espectrometría de masas para identificar polimorfismos y genotipificación de diferentes proteínas en una sola muestra. En cuanto al área de la bioinformática, se ha desarrollado una gran cantidad de bases de datos con información biomédica y asimismo se han realizado programas computacionales empleados para establecer las vías de evolución de los genes que codifican a las betalactamasas de distribución mundial.⁴⁴

1.6 Epidemiología

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI, que amenaza la prevención efectiva y tratamiento de infecciones que ya no son susceptibles a los antimicrobianos comunes utilizados para tratarlas, el problema es especialmente urgente con respecto a la resistencia a los antibióticos en las bacterias. Las bacterias que causan infecciones comunes o graves han desarrollado resistencia a cada nuevo antibiótico que sale al mercado y esto está estrechamente asociada con el uso indiscriminado de antimicrobianos, elecciones inapropiadas o dosis inadecuadas en la práctica clínica. El uso inapropiado de estos fármacos, asociado a la selección y propagación de microorganismos resistentes coloca a todas las especies en una situación de riesgo. Ante esta realidad, la necesidad de actuar para evitar una crisis mundial en desarrollo, en el cuidado de la salud es imperativa.^{45, 46}

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la necesidad de un esfuerzo mundial mejorado y coordinado para contener la RAM.⁴⁷ En 2001 la estrategia mundial de la OMS para la contención de resistencia a antimicrobianos ha proporcionado un marco de intervenciones para ralentizar el fenómeno y reducir la propagación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos. En el 2012 la OMS publicó “La amenaza en evolución de la resistencia a los antimicrobianos: opciones de acción”.^{47, 48} Proponiendo una combinación de intervenciones que incluyen el fortalecimiento de sistemas de salud y vigilancia; mejorando el uso de antimicrobianos en hospitales y en las comunidades; prevención y control de infecciones; alentando al desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas apropiadas; y compromiso político. Siguiendo la indicación de un papel principal para la vigilancia, en abril del 2014, la OMS publicó el primer informe mundial sobre la vigilancia de la RAM, recolectando experiencias de redes nacionales de supervisión.⁴⁸ Este informe muestra que los datos de vigilancia pueden ser muy útiles para orientar opciones de tratamiento, comprensión de las tendencias de la RAM, identificar áreas prioritarias para las intervenciones y monitorear el impacto de esto para contener la resistencia. La falta de supervisión adecuada en muchas

partes del mundo deja grandes lagunas en los conocimientos de la distribución y alcance de este fenómeno.^{47, 48}

El impacto de la resistencia a los antibióticos en términos de mortalidad y de costos de la salud pública es bastante difícil de estimar, y hay pocos estudios que aborden este problema. El Centro para el control y la prevención de enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) estimó de manera conservadora que más de dos millones de personas cada año se ven afectadas por infecciones resistentes a los antibióticos y al menos 23,000 mueren como resultado de las infecciones en ese país.⁴⁹ En Europa cada año, el número de infecciones y muertes debidas a las enfermedades ocasionadas por bacterias multiresistentes como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* entre otras, se estimó en 400,000 y 25,000 respectivamente en 2007.⁵⁰ Sobre la base de escenarios de aumento de la resistencia a los medicamentos hasta 2050, se estima, que a menos que se tomen medidas, las muertes por RAM podría aumentar a 10 millones de vidas cada año para 2050, a un costo acumulado para la producción económica global de 100 billones de dólares. Sobre esta base, para ese año, el número de muertes podría ser de una persona cada 3 segundos.¹⁷

Por otro lado, en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través del Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), implementó el Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) desde finales de 2017.⁵¹ En el PUCRA se articula una red de instituciones de salud que proporcionan información relacionada con la resistencia antimicrobiana y cepas de referencias para investigación, así como varios grupos de profesionistas de diversas disciplinas relacionadas con la RAM. Entre los trabajos realizados en el PUCRA se encuentra el primer reporte del estado actual de la resistencia antimicrobiana en México, en el que se advierte el problema de la RAM en bacterias aisladas en 14 hospitales de México y su consumo anual de antimicrobianos. De igual forma, otro grupo de especialistas ha publicado un reporte de la RAM en 47 instituciones de México en un periodo de 6 meses, que se suma a la evidencia de este problema en el contexto clínico de nuestro país. El análisis integrado y actualizado al 2018 de los resultados se encuentra en el segundo reporte del PUCRA. Para limitar el crecimiento de la

RAM el objetivo debe ser disminuir en una proporción significativa el nivel de consumo actual, tanto en medicina humana, como en veterinaria y en la agroindustria. Deben establecerse metas de reducción del uso a nivel industrial y médico. Es necesario conocer los niveles de consumo actuales y plantear objetivos puntuales, así como designar responsables para su seguimiento y supervisión.⁵¹

1.7 Antecedentes del trabajo.

Se utilizaron aislamientos obtenidos de casos clínicos de caballos ubicados en un rancho ubicado en el Estado de México, de donde se tomaron 64 muestras pertenecientes a diversos órganos, hisopados, así como de agua y alimentos. Los animales presentaban signos de sepsis como petequias en orejas, además de diarreas, convulsiones y algunos morían antes de llegar a los 5 días de vida, en el periodo que comprende de abril a mayo del 2014 (Cuadro 4). Lo animales de forma rutinaria, cuando iniciaban con un cuadro infeccioso se daba tratamiento a base de: penicilina, ceftriaxona, tetraciclina, florfenicol, amikacina, estreptomina gentamicina, así como la combinación de algunos de estos como lo son un betalactámico con un aminoglucósido, finalmente cuando el problema infeccioso no se resolvía se implementaba el uso de antimicrobianos como imipenem o cefepime. Del total de aislamientos, solo 33 fueron géneros bacterianos identificados como enterobacterias. Este trabajo fue realizado previamente en el Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Muestras	Cantidad de muestras
Hisopados vaginal	7
Hisopado rectal / heces	10
Riñón	3
Líquido cefalorraquídeo	3
Hígado	3
Sangre	12
Placenta	6
Intestino delgado	3
Válvula ileocecal	3
Agua	10
Alimento	4
Total de muestras	64
Período que abarcó de abril a mayo del 2014	

Cuadro 4. Ubicación y cantidad de muestras tomadas de los casos clínicos comprendidos en el periodo que va de abril a mayo del 2014

2 Justificación

La resistencia a antimicrobianos se ha convertido en un problema en el área clínica, causado por el empleo indiscriminado de estos fármacos. Las bacterias han adquirido una amplia gama de mecanismos para hacer ineficiente la acción de los quimioterapéuticos y que es posible evidenciar por medio de métodos rutinarios. Sin embargo, en ellos no es posible determinar si el mecanismo reside en los genes bacterianos específicos que le confieren esta capacidad o es dado por mecanismos fisiológicos.

Por lo anterior; la detección de genes de resistencia permitirá conocer la asociación entre la resistencia observada en el fenotipo y genotipo, lo cual permitirá a futuro realizar estudios epidemiológicos sobre la situación de la resistencia en medicina veterinaria. Además, que hasta el momento no existen trabajos en nuestro país que hagan esta evaluación en aislamientos multirresistentes en medicina veterinaria.

3 Hipótesis

El patrón de resistencia observada en antibiogramas de los aislamientos provenientes de cepas multirresistentes de caballos, estará asociado a genes de resistencia y podrá ser evidenciado con el empleo de pruebas de susceptibilidad mediante difusión en agar y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4 Objetivo General

Realizar la determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos a partir de aislamientos bacterianos provenientes de casos clínicos de equinos, mediante la técnica de difusión en agar, así como la detección de genes de resistencia por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para realizar la asociación entre fenotipo y genotipo resistente.

4.1 Objetivos específicos

- Realizar antibiogramas mediante difusión por disco a partir de aislamientos de enterobacterias obtenidos de casos clínicos de caballos.
- Estandarizar la PCR para la detección de genes asociados a resistencia.
- Comparar el perfil de resistencia obtenida en los antibiogramas con la presencia de genes asociados a resistencias en los aislados bacterianos.

5 Material y métodos

5.1 Cepas y medios de cultivo

Se emplearon 33 cepas que se enlistan en el cuadro 6, las cuales estaban almacenadas en leche con glicerol al 20% a -70°C. A partir de estas cepas se realizó la siembra en medio LB y McC, y se verificó su identidad por medio de pruebas bioquímicas (oxidasa, TSI, SIM, citrato y urea) de acuerdo a las técnicas descritas por Jang S.S⁵² Barrow G. I y Feltham R.K.A⁵³. Una vez comprobada la identidad se procedió a las pruebas de susceptibilidad bacteriana y extracción ADN. Por otro lado también se utilizaron plásmidos y cepas proporcionadas por el LMM y el Laboratorio de Diagnostico Bacteriológico de la FMVZ UNAM, los cuales sirvieron como controles para la técnica de PCR y se enlistan en el cuadro 5.

Plásmido	Origen	Control
<i>pSIM</i>	<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>bla</i> TEM 1
<i>pJM13</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>cat</i> 1
Identificación cepas	Origen	Control
968	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>erm, msr</i>
K1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>aac(60)-lb-cr, qnrB, sul2</i>
793 A	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>qnrA</i>
759 B	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>qnrS</i>
34 P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>strA, aadA2, sul1 cmlA</i>
39 P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>tetA</i>
977 B	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>tetB</i>

Cuadro 5 Controles para la estandarización de la PCR

5.2 Pruebas de difusión en agar o antibiograma

Se realizó la prueba de susceptibilidad a quimioterapéuticos de acuerdo a lo reportado por Bauer *et.al.*⁵⁴ utilizando quimioterapéuticos indicados para el tratamiento de enfermedades bacterianas. Para ello se utilizó la técnica de difusión en agar, estandarizando los inóculos a la escala de 0.5 del nefelómetro Mc Farland, (compuesto de BaCl y H₂SO₄), utilizando agar Müeller Hinton de acuerdo a lo establecido por Kirby y BauerA.⁵⁴ Los sensidiscos utilizados fueron: penicilina (P) (10UI) testigo, amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) (30µg), cefalotina (CF) (30µg), cefuroxima (CXM) (30µg), cefotaxima (CTX) (30µg), ceftriaxona (CE) (30µg), cefepima (FEP) (30µg), imipenem (PM) (10µg), clindamicina (CC) (2µg) testigo, sulfametoxazol/trimetroprima (G25) (1.25/23.75 µg), cloranfenicol (C) (30µg), doxiciclina (D) (30µg), kanamicina (K) (30µg), amikacina (K) (30µg), gentamicina (CN) (10µg), eritromicina (E) (15µg) testigo, ácido nalidíxico (NA) (30µg), ciprofloxacina (CIP) (5µg) y norfloxacina (NOR) (10µg), se determinará la resistencia o susceptibilidad a los mismos de acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos de laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) (Clinical and Laboratory Standards Institute).⁵⁵

5.3 Extracción de ADN

Se tomaron 5 colonias de cada aislamiento y se inocularon en un tubo con 10 ml de medio líquido LB para su incubación a 37°C en agitación constante a 200 rpm en un periodo de 18- 24 hrs. El cultivo se utilizó para el proceso de extracción de ADN total por el método de tiocianato de guanidina descrito por Pitcher *et al.*⁵⁶ con algunas modificaciones. Brevemente, transcurrido el tiempo de incubación de los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min en centrifuga refrigerada (IEC®), a la pastilla bacteriana se le agregaron 225 µL de solución de lisis (ver anexo), se agitó vigorosamente en un agitador de vórtice (Vortex® LabNet®) durante 30-60 seg, hasta que la pastilla se disolvió completamente, después se agregaron 125 µL de acetato de amonio frío y se agitó invirtiendo los tubos por diez ocasiones, luego se incubó 10 min en hielo. Una vez concluido el tiempo se agregó un volumen de 300 µL de fenol-cloroformo (ver anexo) y se agitó vigorosamente durante 5 seg procurando que todo el contenido estuviera homogenizado;

posteriormente, se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 5 min en centrifuga refrigerada (LabNet®/Eppendorf®), posteriormente se tomó el sobrenadante de cada tubo y se transfirió a un tubo nuevo, al sobrenadante transferido se le agregaron 300 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (ver anexo) y se agitó vigorosamente durante 5 seg y después se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 5 min. Transcurrido este tiempo se tomó el sobrenadante y se transfirió a tubos nuevos, al sobrenadante transferido se le agregaron 0.1 volúmenes, de acetato de sodio frío (ver anexo); de inmediato se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, los tubos se agitaron invirtiéndolos por 10 ocasiones después se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min, al terminar la centrifugación el sobrenadante de cada tubo fue desechado y a la pastilla de ADN se le agregó 1 mL de etanol al 70% frío y se centrifugaron los tubos 13,000 rpm 10 min al terminar se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla de ADN en baño seco 85 °C 15 min, la pastilla bacteriana se reconstituyó con 50 μ L de agua MiliQ (Merk-Milipore®) y se almacenó a -20°C hasta su uso. El ADN obtenido de este procedimiento fue sometido a la PCR para la detección de genes de resistencia.

Para comprobar la integridad y pureza del ADN obtenido se realizó una electroforesis de ADN en geles de agarosa al 0.8% en amortiguador Tris-Acetato-EDTA (TAE) y se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop®). A partir del valor obtenido respecto a la concentración de ADN extraído, se realizó la dilución del ADN a 100 ng/ μ L. Para la pureza, se tomó en cuenta el valor obtenido en la relación de las longitudes de onda 260/280, aquella muestra que se acercara a un valor de 1.8 se consideraba suficientemente pura, con la cual se realizaron los ensayos de PCR.

Identificación	Genero bacteriano	Muestra
1	<i>Citrobacter sp</i>	Agua de presa
2	<i>Klebsiella sp</i>	Agua de presa
3	<i>Citrobacter sp</i>	Agua de pradera
5	<i>Escherichia coli</i>	Válvula ilieocecal
10	<i>Escherichia coli</i>	Riñón
14	<i>Yersinia sp</i>	Heces
17	<i>Escherichia coli</i>	Hisopado rectal
18	<i>Citrobacter sp</i>	Riñón
19	<i>Klebsiella sp</i>	Hígado
20	<i>Escherichia coli</i>	Hígado
21	<i>Escherichia coli</i>	Riñón
22	<i>Escherichia coli</i>	Heces
24	<i>Escherichia coli</i>	Hisopado rectal
27	<i>Escherichia coli</i>	Válvula ilieocecal
29	<i>Enterobacter sp</i>	Intestino delgado
30	<i>Klebsiella sp</i>	Intestino delgado
31	<i>Enterobacter sp</i>	Estómago
32	<i>Enterobacter sp</i>	Intestino delgado
33	<i>Enterobacter sp</i>	Intestino delgado
34	<i>Yersinia sp</i>	Estómago
35	<i>Escherichia coli</i>	Placenta
35 A	<i>Enterobacter sp</i>	Placenta
37	<i>Escherichia coli</i>	Placenta
A	<i>Escherichia coli</i>	Intestino delgado
C	<i>Klebsiella sp</i>	Bazo
D	<i>Klebsiella sp</i>	Intestino grueso
E	<i>Escherichia coli</i>	Hígado
F	<i>Escherichia coli</i>	Macerado de órganos
G	<i>Escherichia coli</i>	Hígado
H	<i>Citrobacter sp</i>	Intestino grueso
I	<i>Citrobacter sp</i>	Macerado de órganos
J	<i>Enterobacter sp</i>	Hisopado vaginal
K	<i>Klebsiella sp</i>	Macerado de órganos

Cuadro 6. Identificación y procedencia de las muestras

5.4 Extracción de Plásmido

Se realizó el método de extracción de plásmido Maxi-prep de lisis alcalina descrito por Sambrock *et al.* 1989.⁵⁷ con algunas modificaciones. Brevemente, las colonias se sembraron en 2mL de caldo LB y se incubaron durante 12-18 h en agitación a 220 rpm. Se centrifugaron a 4000 rpm (centrífuga IEC®), durante 10 min a temperatura ambiente y se decantó el medio. La pastilla bacteriana se suspendió en 100 µL de solución I (ver anexo) se homogenizó en vórtex y se mantuvo a temperatura ambiente (19-25°C) durante 10 min, después se agregaron 200 µL de solución II recién preparada (ver anexo) y se mezcló con pipeteo suave hasta que la solución aclaró y se volvió viscosa. Se colocó en hielo por 10 min al término de los cuales se agregó solución III (ver anexo) mezclando con vórtex invirtiendo el tubo durante 10 segundos, se mantuvo 5 min en hielo y se centrifugó a 12 rpm durante 5 min a 4°C. se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo, el ADN fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol e incubado durante 1 h en hielo. Después se centrifugó a 12 000 rpm/5 min a 4°C (centrífuga Labnet®), se decantó el isopropanol y la pastilla se limpió con 1 mL de etanol frío al 70% mediante centrifugación a 12 000 rpm/5 min a 4°C. Una vez que el comprimido se deshidrató, fue suspendido en agua MiliQ® estéril y almacenado a -20°C hasta su utilización.

5.6 Estandarización de PCR punto final

Se emplearon las secuencias de iniciadores ya reportados para varios genes de resistencia (cuadro 7) y se establecieron las condiciones de temperatura que se usaron para la amplificación de los genes a evaluar. Además, considerando el cálculo de las temperaturas de alineamiento respecto a la temperatura de fusión proporcionadas por el fabricante de los iniciadores (Sigma Aldrich®), se emplearon los programas con las constantes de temperatura y tiempo como se enlistan en el (cuadro 8). Previo a los ensayos de PCR se comprobó por medio de ensayos *in silico* y empleando las herramientas Blast del National Center Biotechnology information y SnapGene V.4.1 el alineamiento de los iniciadores y los amplificadores.

Cuadro 7. Iniciadores específicos para la identificación de genes de resistencia.

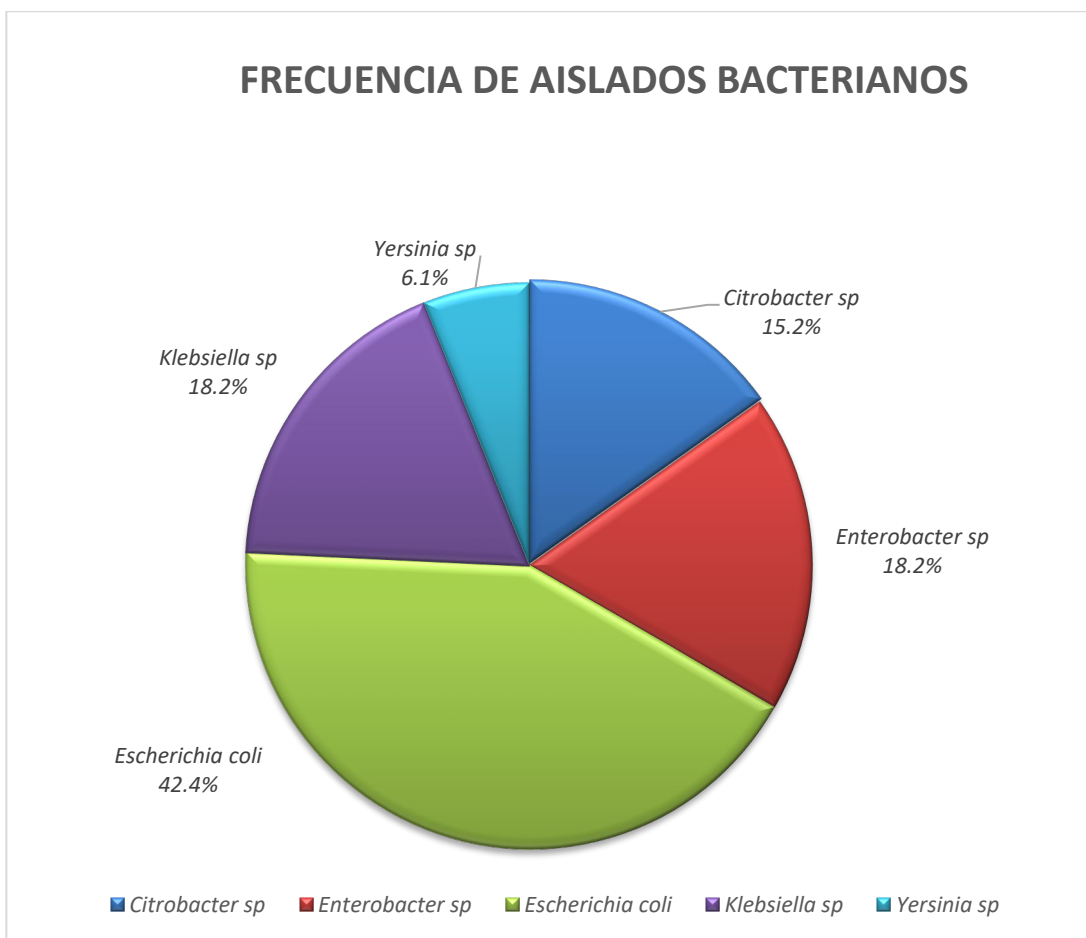
Gen	Secuencia (5'-3')	Amplificado	Referencia
<i>bla</i> TEM	GCACGAGTGGGTTACATCGA	311 pb	Teerarat Prasertsee <i>et al.</i> 2016 ⁵⁸
<i>bla</i> TEM	GGTCCTCCGATCGTTGTCAG		
<i>sul1</i>	TTTCCTGACCCTGCGCTCTAT	425 pb	Yemisi Olukemi <i>et al.</i> 2017 ⁵⁹
<i>sul1</i>	GTGCGGACGTAGTCAGCGCCA		
<i>sul2</i>	CCTGTTTTCGTCCGACACAGA	435 pb	Yemisi Olukemi <i>et al.</i> 2017 ⁵⁹
<i>sul2</i>	GAAGCGCAGCCGCAATTCAT		
<i>cat 1</i>	CTTGTCGCCTTGCGTATAAT	508 pb	Terence Odoch <i>et al.</i> 2018 ⁶⁰
<i>cat 1</i>	ATCCCAATGGCATCGTAAAG		
<i>cmlA</i>	TGTCATTTACGGCATACTCG	435 pb	Terence Odoch <i>et al.</i> 2018 ⁶⁰
<i>cmlA</i>	ATCAGGCATCCCATTCCCAT		
<i>tetA</i>	TTGGCATTCTGCATTCACTC	494 pb	Yemisi Olukemi <i>et al.</i> 2017 ⁵⁹
<i>tetA</i>	GTATAGCTTGCCGGAAGTCG		
<i>tetB</i>	CAGTGCTGTTGTTGTCATTAA	571 pb	Yemisi Olukemi <i>et al.</i> 2017 ⁵⁹
<i>tetB</i>	GCTTGGAAACTGAGTGTTAA		
<i>strA</i>	CCTGGTGATAACGGCAATTC	548 pb	Teerarat Prasertsee <i>et al.</i> 2016 ⁵⁸
<i>strA</i>	CCAATCGCAGATAGAAGGC		
<i>aadA2</i>	CGGGACCATCGAAATTTTCG	250 pb	Teerarat Prasertsee <i>et al.</i> 2016 ⁵⁸
<i>aadA2</i>	CTATAGCGCGGAGCGTCTCGC		
<i>aac(60)-lb-cr</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482 pb	Amir Majlesi <i>et al.</i> 2017 ⁶¹
<i>aac(60)-lb-cr</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
<i>qnrA</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516 pb	Yemisi Olukemi <i>et al.</i> 2017 ⁵⁹
<i>qnrA</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
<i>qnrB</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469 pb	Yemisi Olukemi <i>et al.</i> 2017 ⁵⁹
<i>qnrB</i>	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
<i>qnrS</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417 pb	Yemisi Olukemi <i>et al.</i> 2017 ⁵⁹
<i>qnrS</i>	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
<i>erm</i>	ATGCCAGCATATAAATCGC	271 pb	Simon Rose <i>et al.</i> 2017 ⁶²
<i>erm</i>	ATATGGACAAAGATAGCCCG		
<i>msr</i>	TATAGCGACTTTAGCGCCAA	395 pb	Simon Rose <i>et al.</i> 2017 ⁶²
<i>msr</i>	GCCGTAGAATATGAGCTGAT		

Cuadro 8 Condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)						
	<i>blaTEM-1 cat1 cmIA strA</i>		<i>sul1 sul2 tetA tetB qnrS</i>		<i>erm msr</i>	
	<i>aadA2 aac (60)-Ib-cr qnrB qnrA</i>		T°	Tiempo	T°	Tiempo
	T°	Tiempo				
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 seg	94°C	60 seg	94°C	30 seg
Alineamiento	56°C	30 seg	60°C	60 seg	60°C	30 seg
Extensión	72°C	30 seg	72°C	30 seg	72°C	45 seg
Extensión final	72°C	5 min	72°C	10 min	72°C	5 min

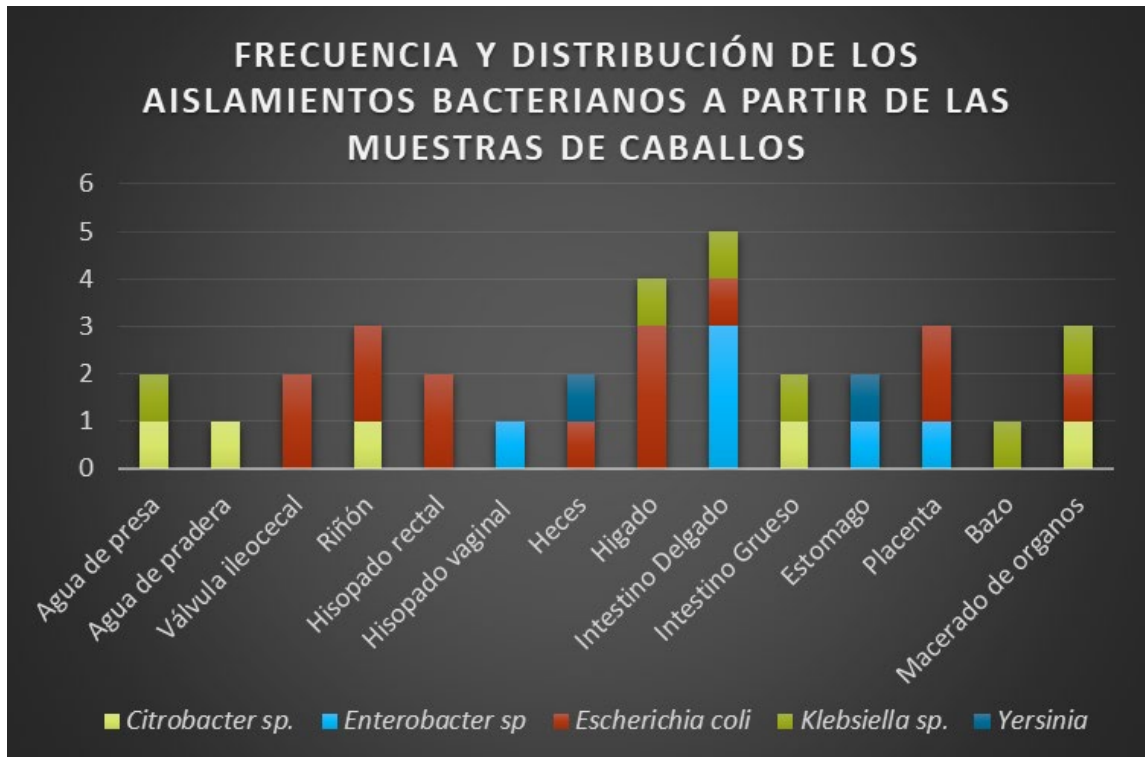
6 Resultados

6.1 Aislamientos

De un total de 33 aislamientos obtenidos de las muestras clínicas y almacenadas; se comprendían las especies o generos *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Citrobacter sp*, y *Yersinia sp* como se muestra en la gráfica 1. En la gráfica 2 se puede observar la frecuencia y distribución de los aislamientos bacterianos a partir de muestras clínicas de caballos.



Grafica 1. Frecuencia de aislados bacterianos: Se observa la frecuencia de los aislamientos bacterianos, de un n=33 los porcentajes fueron los siguientes: 42.4% (n=14) pertenecían a *Escherichia coli* siendo las más frecuente, seguido de *Klebsiella sp*. *Enterobacter sp* con un 18.2% (n=6), *Citrobacter sp* 15.2% (n=5) y la que en menor



Grafica 2. Frecuencia y distribución de los aislamientos bacterianos a partir de las muestras de caballos: agua de presa n=2, agua de pradera n=1, válvula ileocecal n=2, riñón n=3, hisopado rectal n=2, hisopado vaginal n=1, heces n=2, hígado n=4, intestino delgado n=5, intestino grueso n=2, estomago n=2, placenta n=3, bazo n=1 y macerado de órganos n=3. Los géneros bacterianos representan con los diferentes colores.

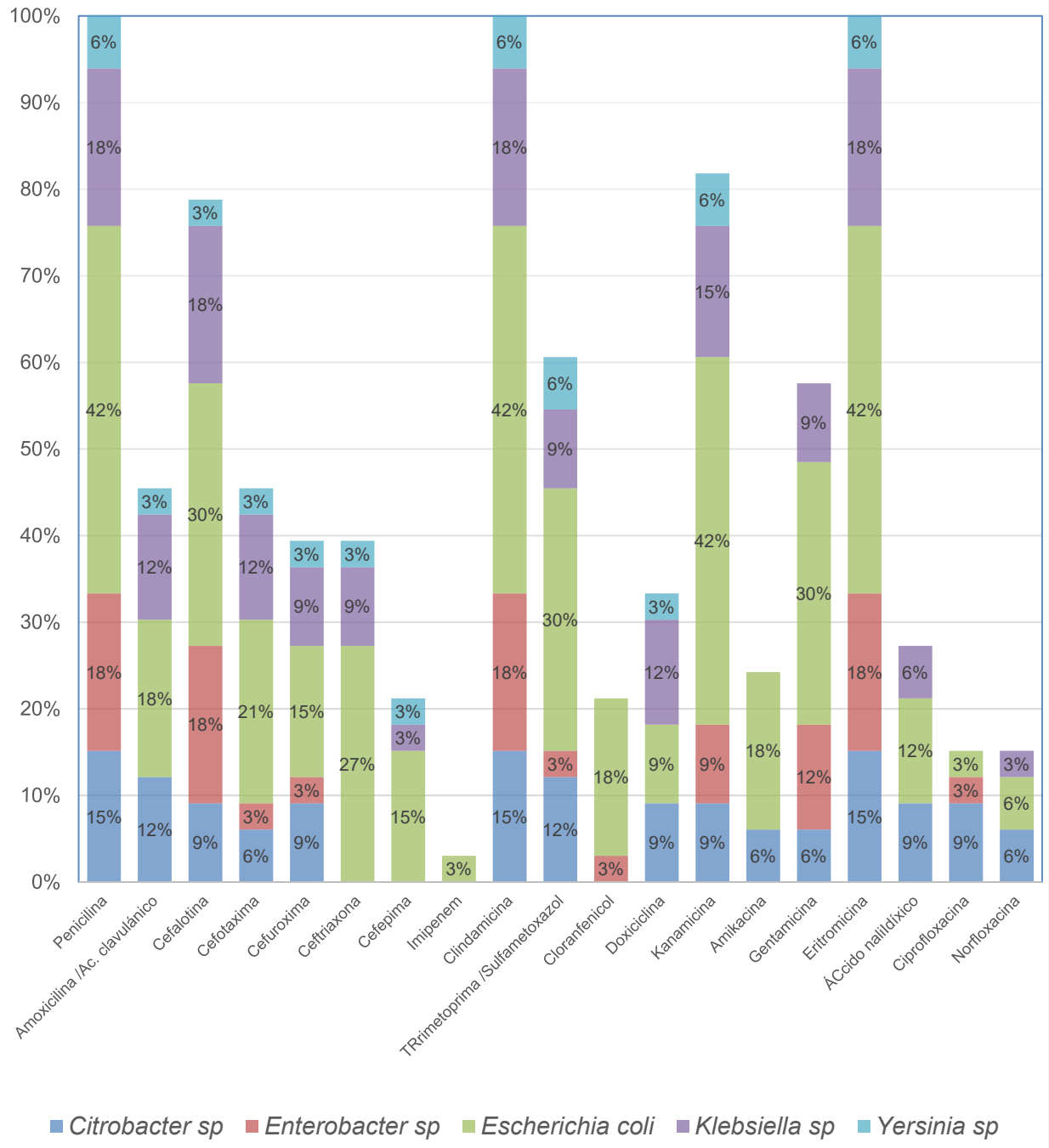
6.2 Susceptibilidad a quimioterapéuticos mediante la técnica de difusión en agar o antibiograma

En el cuadro 9 se muestra el patrón de resistencia y susceptibilidad de los aislamientos a partir de los antibiogramas, siendo todos multirresistentes ya que todas las bacterias presentaban resistencia a al menos 3 grupos de antimicrobianos. Por otro lado en la gráfica 11 se puede observar la frecuencia y distribución de resistencia obtenidas en el antibiograma. El 100% de los aislamientos fueron resistentes a Penicilina, Clindamicina y Macrólidos, 81% a Kanamicina, 78% a Cefalotina, 60% a Sulfametoxazol / Trimetoprima, 57% a Gentamicina, 45% a Amoxicilina/Ácido clavulánico y Cefotaxima, 39% a Cefuroxima y Ceftriaxona, 33% a Doxiciclina, 27% al Ácido Nalidíxico, 24% a Amikacina, 21% a Cefepima y Cloranfenicol, 15% a Ciprofloxacina y Norfloxacina y finalmente un 3% a Imipenem

Cepas / identificación proporcionada por el laboratorio	P	AMC	CF	CXM	CTX	CE	FEP	PM	CC	G 25	C	D	K	A	CN	E	NA	CIP	NOR	Resistencias	
<i>Citrobacter</i> sp. (1)	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	13	
<i>Klebsiella</i> sp. (2)	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	10	
<i>Citrobacter</i> sp. (3)	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	9	
<i>Escherichia coli</i> (5)	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	5	
<i>Escherichia coli</i> (10)	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	7	
<i>Yersinia</i> sp. (14)	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	10	
<i>Escherichia coli</i> (17)	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	10	
<i>Citrobacter</i> sp.(18)	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	11	
<i>Klebsiella</i> sp. (19)	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	10	
<i>Escherichia coli</i> (20)	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	7	
<i>Escherichia coli</i> (21)	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	7	
<i>Escherichia coli</i> (22)	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	13	
<i>Escherichia coli</i> (24)	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	11	
<i>Escherichia coli</i> (27)	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	17
<i>Enterobacter</i> sp.(29)	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	5	
<i>Klebsiella</i> sp. (30)	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	6	
<i>Enterobacter</i> sp.(31)	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	5	
<i>Enterobacter</i> sp. (32)	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	9	
<i>Enterobacter</i> sp. (33)	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	5	
<i>Yersinia</i> sp. (34)	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	7	
<i>Escherichia coli</i> (35)	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	8	
<i>Enterobacter</i> sp. (35A)	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	5	
<i>Escherichia coli</i> (37)	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	7	
<i>Escherichia coli</i> A	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	12	
<i>Klebsiella</i> sp. C	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	9	
<i>Klebsiella</i> sp. D	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	10	
<i>Escherichia coli</i> E	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	12	
<i>Escherichia coli</i> F	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	12	
<i>Escherichia coli</i> G	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	13	
<i>Citrobacter</i> sp. H	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	8	
<i>Citrobacter</i> sp. I	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	8	
<i>Enterobacter</i> sp. J	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	7	
<i>Klebsiella</i> sp. K	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	12	

Cuadro 9 Patrón de susceptibilidad y resistencia de los aislamientos a los diferentes antibióticos. Se representa con una “R” las bacterias resistentes y “S” las susceptibles. **P** (Penicilina) **AMC** (Amoxicilina / Ácido clavulánico) **CF** (Cefalotina) **CXM** (Cefuroxima) **CTX** (Cefotaxima) **CE** (Ceftriaxona) **FEP** (Cefepime) **PM** (Imipenem) **CC** (Clindamicina) **G 25** (Sulfametoxazol / Trimetoprima) **C** (Cloranfenicol) **D** (Doxiciclina) **K** (Kanamicina) **A** (Amikacina) **CN** (Gentamicina) **E** (Eritromicina) **NA** (Ácido Nalidíxico) **CIP** (Ciprofloxacina) **NOR** (Norfloxacina)

FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE RESISTENCIA EN ENTEROBACTERIAS



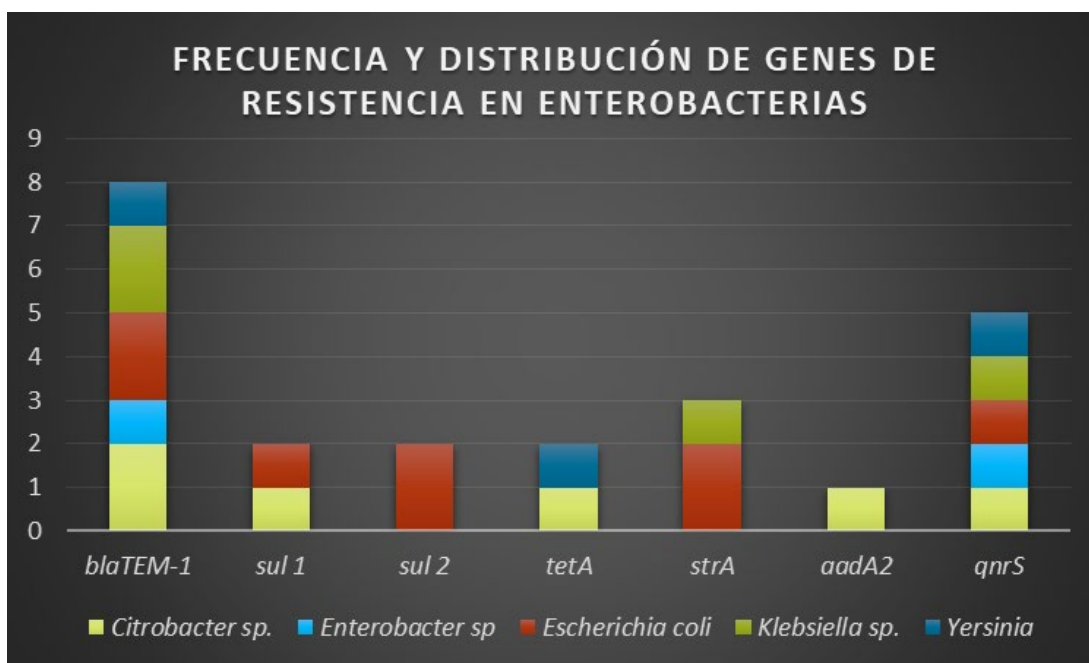
Grafica 3 Frecuencia y distribución de resistencia en enterobacterias. Se observa que el 100% de los aislamientos fueron resistentes a Penicilina, Clindamicina y Macrólidos, 81% a Kanamicina, 78% a Cefalotina, 60% a Sulfametoxazol / Trimetoprima, 57% a Gentamicina, 45% a Amoxicilina/Ácido clavulánico y Cefotaxima, 39% a Cefuroxima y Ceftriaxona, 33% a Doxiciclina, 27% al Ácido Nalidíxico, 24% a Amikacina, 21% a Cefepima y Cloranfenicol, 15% a Ciprofloxacina y Norfloxacina y finalmente un 3% a Imipenem

6.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Se determinó, mediante PCR punto final, la presencia de los genes *tetB*, *cat1*, *cmIA*, *aac(60)-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *mph*, *msr*, *blaTEM-1*, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *strA*, *aadA2* y *qnrS*, en los 33 aislamientos, de los cuales *blaTEM-1* fue el gen que se detectó con mayor frecuencia en 8 aislamientos seguido de *qnrS* en cinco, *strA* en tres y finalmente *sul1*, *sul2*, *tetA* y *aadA2* únicamente en dos aislamientos como se observa en el cuadro 10. En la gráfica 4 se observa la frecuencia y distribución de genes de resistencia en los aislamientos obtenidos de los casos clínicos.

Cepas	<i>blaTEM 1</i>	<i>Sul1</i>	<i>Sul2</i>	<i>tetA</i>	<i>strA</i>	<i>aadA2</i>	<i>qnrS</i>
<i>Citrobacter sp.</i> (1)							
<i>Klebsiella sp.</i> (2)							
<i>Citrobacter sp.</i> (3)							
<i>Escherichia coli</i> (17)							
<i>Citrobacter sp.</i> (18)							
<i>Klebsiella sp.</i> (19)							
<i>Escherichia coli</i> (20)							
<i>Escherichia coli</i> (21)							
<i>Klebsiella sp.</i> (30)							
<i>Enterobacter sp.</i> (32)							
<i>Yersinia sp.</i> (34)							
<i>Escherichia coli</i> E							
<i>Escherichia coli</i> F							
<i>Enterobacter sp.</i> J							
<i>Klebsiella sp.</i> K							

Cuadro 10 Genes detectados mediante la PCR. Se observa en un cuadro de color rojo aqueas muestras que dieron positivas a alguno de los genes evaluados



Grafica 4 Frecuencia y distribución de genes de resistencia en enterobacterias. Se observa aquellos genes que fueron detectados, *blaTEM-1* en 8 aislamientos siendo el más frecuente, seguido de *qnrS* detectado en 5, *strA* en 3 y *sul 1*, *sul 2*, *tetA* y *aadA2* en 2 aislamientos. Los colores representan los géneros bacterianos en los que se encontraron los diversos genes.

6.4 Geles de agarosa

En la figura 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se observan los productos de amplificación de la PCR correspondiente a los genes *blaTEM-1*, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *strA*, *aadA2* y *qnrS*.

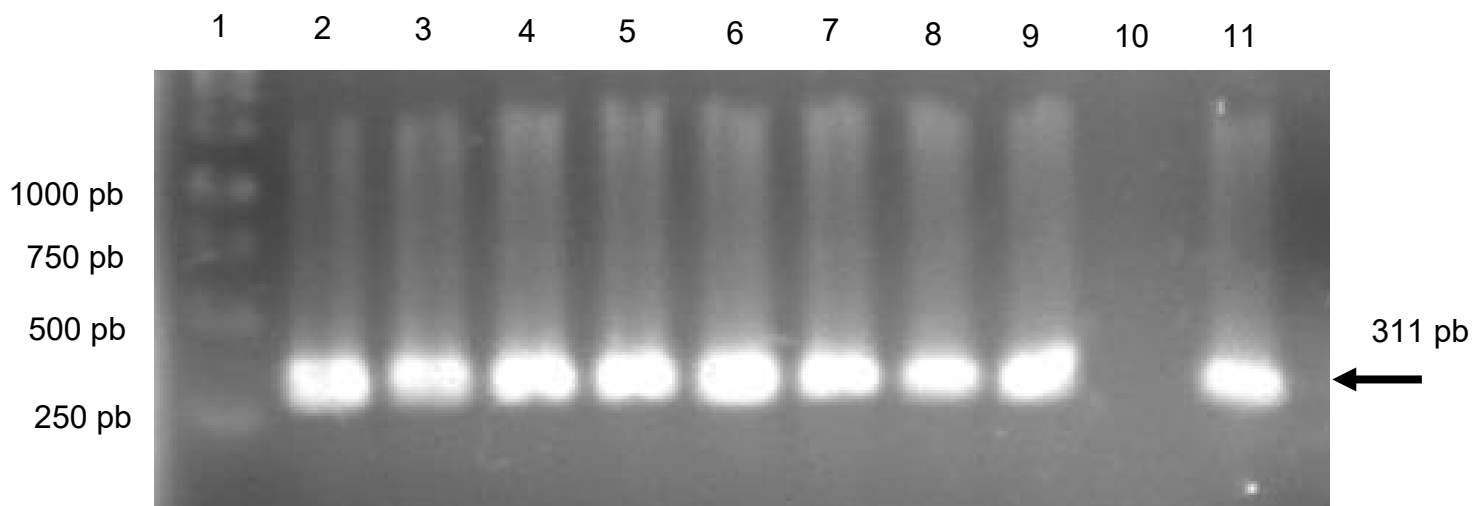


Figura 3: Amplificación del gen de resistencia *blaTEM-1*: 1.- MPM 1kb, 2.- aislamiento de muestra 2, 3.- aislamiento de muestra 3, 4.- aislamiento de muestra 18, 5.- aislamiento de muestra 21, 6.- aislamiento de muestra 30, 7.- aislamiento de muestra 32, 8.- aislamiento de muestra E, 9.- aislamiento de muestra K, 10.- control negativo (-) 11.- control positivo (+)

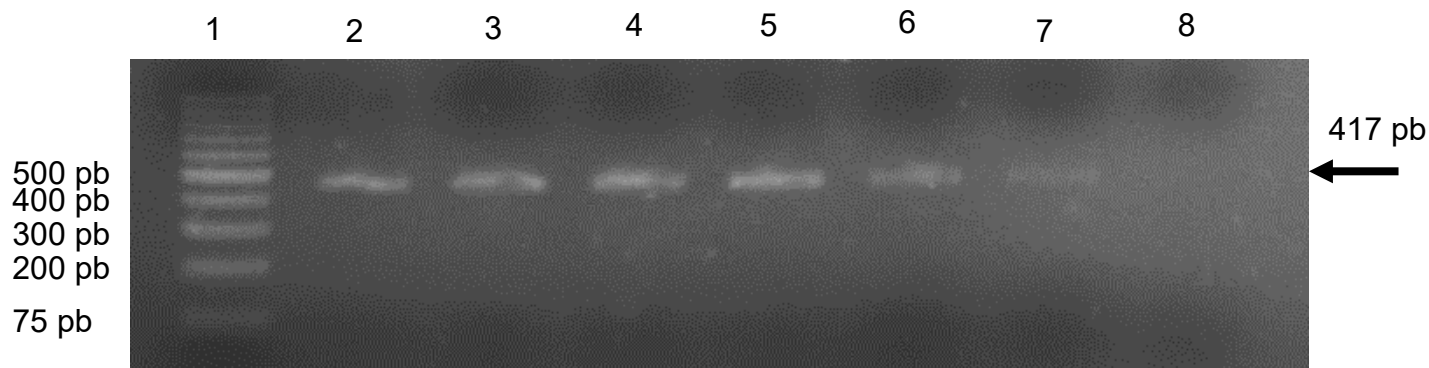


Figura 4: Amplificación del gen de resistencia gen *qnrS*: 1.- MPM 1kb plus, 2.- aislamiento de muestra 2, 3.- aislamiento de muestra 3, 4.- aislamiento de muestra 17, 5.- aislamiento de muestra 34, 6.- aislamiento de muestra J, 7.- control positivo (+), 8.- control negativo (-).

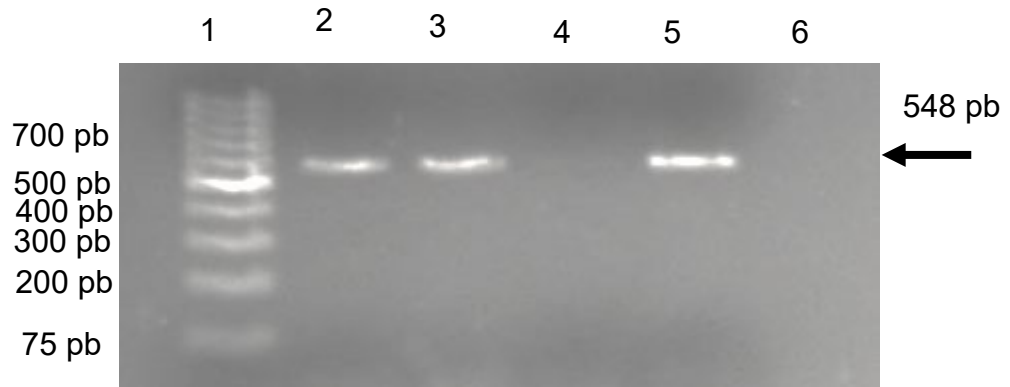


Figura 5: Amplificación del gen de resistencia gen *strA*: 1.- MPM 1kb plus, 2.- aislamiento de muestra 19, 3.- aislamiento de muestra 20, 4.- aislamiento de muestra f, 5.- control positivo (+) 6.- control negativo

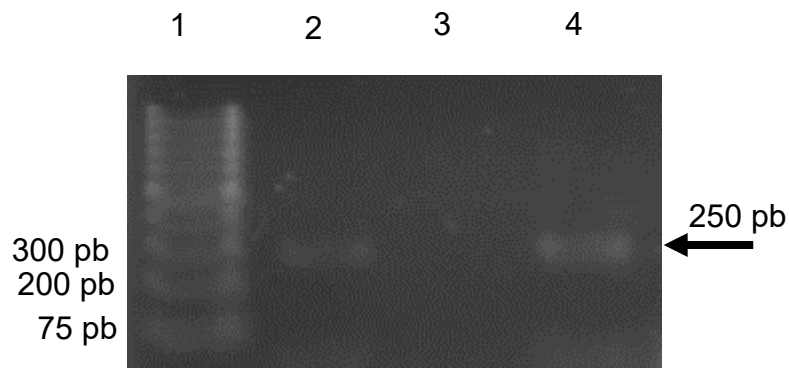


Figura 6 Amplificación del gen de resistencia gen *aadA*: 1.- MPM 1kb plus, 2.- aislamiento de muestra 1, 3.- control negativo (-), 4.- control control positivo (+)

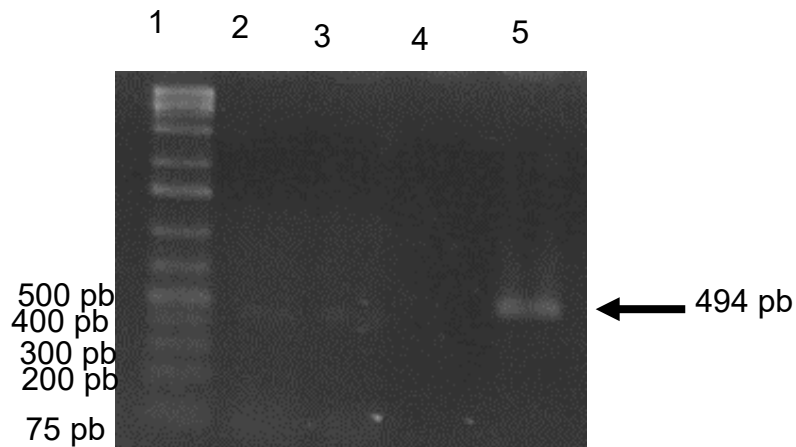


Figura 7 Amplificación del gen de resistencia gen *tetA*: 1.- MPM 1kb plus, 2.- aislamiento de muestra 1, 3.- aislamiento de muestra 34, 4.- control negativo (-), 5.- control positivo (+)

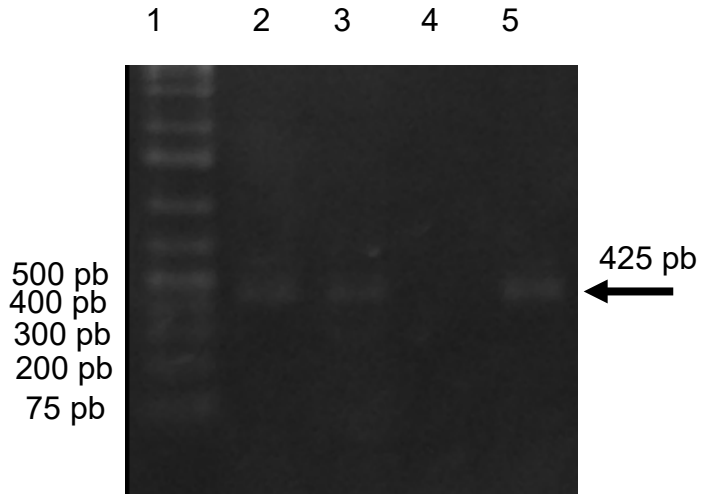


Figura 8 Amplificación del gen de resistencia gen *sul1*: 1.- MPM 1kb plus, 2.- aislamiento de muestra 1, 3.- aislamiento de muestra 20, 4.- control negativo (-), 5.- control positivo (+)

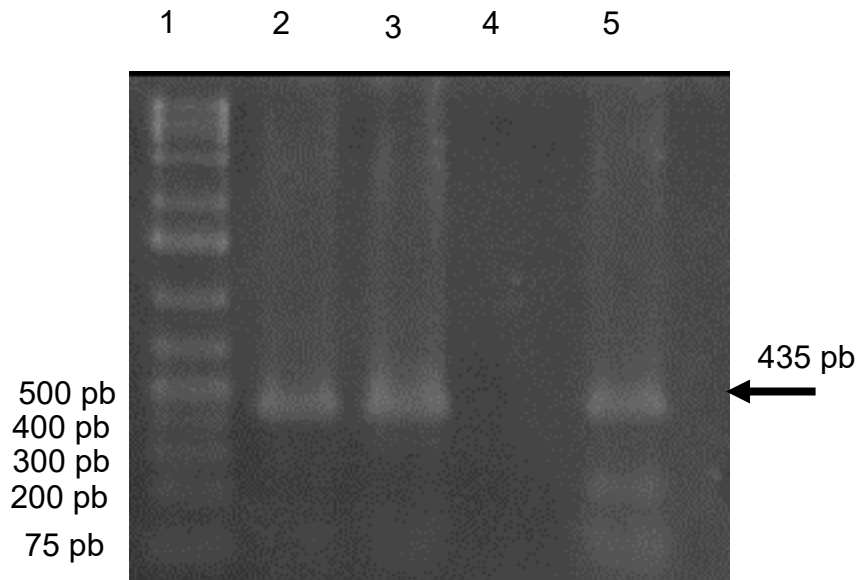


Figura 9 Amplificación del gen de resistencia gen *sul2*: 1.- MPM 1kb plus, 2.- aislamiento de muestra 20, 3.- aislamiento de muestra F, 4.- control negativo (-), 5.- control positivo (+)

6.5 Comparación de la expresión fenotípica y genotípica

En la tabla 4 se observa la comparación de la expresión fenotípica y genotípica de resistencia. En su mayoría la detección de los genes concuerda con que la cepa presenta resistencia fenotípica evidenciada en el antibiograma a alguno o a la mayoría de los antibióticos evaluados y en las que ejerce su efecto. Por otro lado hubo algunas casos como la cepa F en donde el antibiograma fue susceptible a sulfametoxazol / trimetoprim pero presentaba el gen *sul2* o la cepa 3 y 34 que es susceptible a ácido nalidíxico, ciprofloxacina y norfloxacina pero se detectó el gen *qnrS*.

Cepas	P	AMC	CF	CXM	CTX	CE	FEP	PM	G 25	C	CC	D	K	A	CN	NA	CIP	NOR	E		blaTEM-1	Sul1	Sul2	cat	cmlA	tetA	tetB	strA	aadA2	aac(60)-lb-cr	qnrA	qnrB	qnrS	mph	msr		
Citrobacter sp. (1)																																					
Klebsiella sp. (2)																																					
Citrobacter sp. (3)																																					
Escherichia coli (5)																																					
Escherichia coli (10)																																					
Yersinia sp. (14)																																					
Escherichia coli (17)																																					
Citrobacter sp.(18)																																					
Klebsiella sp. (19)																																					
Escherichia coli (20)																																					
Escherichia coli (21)																																					
Escherichia coli (22)																																					
Escherichia coli (24)																																					
Escherichia coli (27)																																					
Enterobacter sp.(29)																																					
Klebsiella sp. (30)																																					
Enterobacter sp.(31)																																					
Enterobacter sp. (32)																																					
Enterobacter sp. (33)																																					
Yersinia sp. (34)																																					
Escherichia coli (35)																																					
Enterobacter sp. (35A)																																					
Escherichia coli (37)																																					
Escherichia coli A																																					
Klebsiella sp. C																																					
Klebsiella sp. D																																					
Escherichia coli E																																					
Escherichia coli F																																					
Escherichia coli G																																					
Citrobacter sp. H																																					
Citrobacter sp. I																																					
Enterobacter sp. J																																					
Klebsiella sp. K																																					

Betalactámico	Sulfonamidas	Fenicoles	Lincosamidas	Tetraciclina	Aminoglucósidos	Quinolonas	Macrólidos
---------------	--------------	-----------	--------------	--------------	-----------------	------------	------------

Cuadro 11 Comparación de la expresión fenotípica y genotípica P (penicilina) AMC (amoxicilina / ácido clavulánico) CF (cefalotina) CXM (cefuroxima) CTX (cefotaxima) CE (ceftriaxona) FEP (cefepime) PM (imipenem) CC (clindamicina) G 25 (sulfametoxazol / trimetoprima) C (cloranfenicol) D (doxiciclina) K (kanamicina) A (amikacina) CN (gentamicina) E (eritromicina) NA (ácido nalidixico) CIP (ciprofloxacina) NOR (norfloxacina)
BlaTEM-1 (Betalactamasa TEM1) **sul1 sul2** (dihidropteroato sintetasa tipo 1 y 2) **Cat cmlA** (Cloranfenicol acetiltransferasa) **tetA tetB** (Bomba de eflujo) **strA** (adeniltransferasa) **aadA2** (nucleotidil transferasa) **aac(60)-lb-cr** (Aminoglucósido acetiltransferasa) **qnrA qnrB qnrS** (Proteínas de protección al sitio blanco) **mph** (Fosfotransferasa) **msr** (Bomba de eflujo)

Discusión

En este trabajo se evaluó la resistencia fenotípica con antibiogramas y genotípica mediante la amplificación de genes asociados a resistencia por PCR, *bla*TEM-1, *sul1*, *sul2*, *cat1*, *cmlA*, *tetA*, *tetB*, *strA*, *aadA-2*, *aac (60)-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *erm* y *msr* de 33 cepas de enterobacterias aisladas de caballos.

El principal patógeno aislado fue *E.coli* con 42.4%, seguido de *Klebsiella* sp y *Enterobacter* sp con un 18.2%, *Citrobacter* sp 15.1% y *Yersinia* sp con un 6.1% fueron aisladas de muestras de válvula ileocecal, riñón, hisopos rectales, hisopos vaginales, heces, hígado, intestino delgado, intestino grueso, estomago, placenta, bazo, macerado de órganos y de muestras ambientales como agua de pradera y de presa. Estos géneros son de gran importancia, en especial *E. coli* y *Klebsiella*, los cuales son considerados como patógenos versátiles con capacidad de adaptación al intestino de los mamíferos, pero también a otros entornos en el medio ambiente. Por otro lado, la importancia clínica de la resistencia a los antibióticos entre las enterobacterias es probable que difiera entre especies, con respecto a su riesgo.⁶³

Escherichia coli, además de ser la especie bacteriana que se aisló con mayor frecuencia, también fue el microorganismo que se encontró en la mayoría de las muestras evaluadas de válvula ileocecal, riñón, hisopos rectales, heces, hígado, intestino delgado, placenta y macerado de órganos. Este microorganismo constituye el habitante facultativo más importante del intestino grueso, tanto del hombre como de animales de sangre caliente y de igual forma, es parte de la microbiota en el hospedador sano.² Aunque la mayoría de las cepas no son patógenas, pueden comportarse como microorganismos oportunistas que causan infección en un hospedador inmunocomprometido.² Fisiológicamente es versátil, está adaptada a las características del hábitat, puede crecer en un medio con glucosa como única fuente orgánica. Puede crecer en presencia de oxígeno y bajo condiciones anaeróbicas, puede proliferar por fermentación, produciendo una mezcla de ácidos y gas como productos finales.⁴ Esta versatilidad le confiere la habilidad para adaptarse al hábitat intestinal (anaeróbico) y extra intestinal (aeróbico o anaeróbico).^{2, 4} Esta podría ser la causa de que se encontrara a este agente en un

porcentaje mayor al de las demás enterobacterias, sin embargo, no se obtuvo en ninguna de las muestras del medio ambiente.

Por otra parte, *Klebsiella* sp fue uno de los géneros aislados de muestras de hígado, intestino delgado, intestino grueso y macerado de órganos, también fue aislada de una muestra de agua de presa. Según la literatura, este microorganismo tiene la capacidad de diseminación en las superficies mucosas del hospedero, debido a la diversidad de expresión de sus factores de virulencia, generando infecciones en diferentes sitios anatómicos, colonizando distintos nichos ecológicos.⁶⁴ En el caso de los aislamientos *Enterobacter* sp, estos fueron obtenidos a partir de muestras de hisopos vaginales, intestino delgado, estómago y placenta. Este patógeno se encuentra como comensal en el medio ambiente, piel y tracto gastrointestinal y debido a su ubicuidad, la fuente de infección puede ser endógena o exógena.⁶⁵

Citrobacter y *Yersinia* sp son agentes etiológicos que pueden ocasionar infecciones extra intestinales, similares a las descritas por otros bacilos Gram negativos, tales como; infecciones en vías urinarias, tracto respiratorio, intraabdominal, de la vía biliar, heridas y sistema nervioso central, también, puede causar bacteriemia y septicemia.^{4, 66} En el caso de *Yersinia* sp, se aisló únicamente de muestras provenientes de heces y estómago. Por otro lado, *Citrobacter* sp, además de ser aislada de muestras de órganos como intestino grueso, riñón y macerado de órganos, también lo fue de muestras de agua de presa y pradera. Existen bacterias Gram negativas pertenecientes a diferentes géneros que pueden ser contaminantes de cuerpos de agua. Sin embargo, el grupo bacteriano que cumple con las características de potencial biomarcador de calidad de agua es el de las enterobacterias, corresponden al 10% de los microorganismos intestinales humanos y animales, por lo que su presencia en el agua está asociado a contaminación fecal.⁶⁷ Dentro de este grupo se encuentra *Citrobacter* sp, siendo unos de los microorganismos que se encuentra en grandes cantidades en fuentes de agua, vegetación y suelos, por lo que no está asociada necesariamente con contaminación fecal y puede o no representar un riesgo para la salud.⁶⁷

Ahora bien, el 100% de los aislamientos evaluados fueron resistentes a penicilina, clindamicina y eritromicina, esto debido a que las enterobacterias presentan una resistencia intrínseca a estos fármacos a causa de una baja permeabilidad de su membrana.^{10,68} En el caso particular de los macrólidos la literatura menciona que muestran una baja a moderada actividad frente a este grupo de microorganismos, debido a que en localizaciones como el tracto gastrointestinal, donde el pH es alcalino, la concentración de estos medicamentos es muy alta y se produce un efecto potencializado de la actividad de los macrólidos. Esto determina que algunos de los antimicrobianos de esta familia se utilicen para tratamientos de infecciones intestinales causadas por enterobacterias.^{68, 69} Por sus características químicas, el macrólido más activo sobre bacilos Gram negativos es la azitromicina.^{68, 69}

Los betalactámicos forman parte de los antibióticos que más se usan para tratar infecciones, pero también es el grupo al cual más resistencia se presenta, esto se debe en gran parte a la presencia de betalactamasas.^{70,71} Se documentó que los genes de las betalactamasas (*bla*) eran cromosómicos, desde la aparición de los primeros informes sobre plásmidos *blaTEM-1* en la década de 1960, se ha reportado que muchos parecen ser mutantes de los genes TEM clásicos, así como nuevos tipos como SHV, CTX y OXA, pueden desarrollar resistencia mediada por betalactamasas *in vivo* durante la quimioterapia.⁷² Lo que respalda la opinión predominante de que los plásmidos que poseen betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son conjugados, es que pueden ser transmitidos por transposones y que los genes pueden tener altas frecuencias de mutación.⁷³ También es motivo de preocupación la creciente difusión de BLEE entre especies hasta ahora de tipo silvestre.⁷⁴

El gen que con mayor frecuencia se encontró fue *blaTEM-1* en 8 aislamientos (24.2%). La familia TEM de las betalactamasas de espectro extendido constituye el mayor y más amplio grupo diseminado de estas enzimas.^{73, 75,76} Sus precursores evolutivos son las penicilinasas TEM-1 y TEM-2 de los cuales, TEM-1 está codificado por una serie de alelos de los genes, *blaTEM-1A* - *blaTEM-1F*, que se diferencian entre sí por mutaciones específicas silenciosas. Cada uno de estos

genes podría iniciar un linaje evolutivo separado de derivados mutantes.^{75, 76} La enzima TEM-1 es la betalactamasa que se ha descrito con mayor frecuencia en Gram negativos, fue identificada por primera vez en una *Escherichia coli* en Grecia.^{77, 78} Esta confiere resistencia a la ampicilina, penicilina y cefalosporinas de primera generación, como la cefalotina. Este tipo de betalactamasas se ha expandido rápidamente y es ahora una de las más dominantes en muchos países.³⁷

Las cepas en las que se detectó esta enzima fueron: 2, 3, 18, 21, 30, 32, E y K; dentro de los antimicrobianos evaluados en este trabajo mediante el antibiograma y sobre el cual tiene efecto blaTEM-1 es la cefalotina. Las cepas 2, 21, 30, 32, E y K presentaron una resistencia a este antimicrobiano, que se podría asociar al efecto de esta enzima.^{3,79} Sin embargo se observó que las cepas 3 y 18 mostraron susceptibilidad, este resultado se puede deber a que los genes que codifican estas enzimas se pueden encontrar en el cromosoma o elementos genéticos móviles y su producción puede ser constitutiva o inducible, esto último sugeriría una baja producción de esta enzima, ocasionando una sensibilidad a este antimicrobiano en las pruebas de difusión en agar.^{31,79} En el caso de la cepa 3, fue resistente a cefalosporinas de segunda y tercera generación como lo son cefuroxima y cefotaxima respectivamente, además también a la amoxicilina con ácido clavulánico. La cepa 18 fue resistente a este último antimicrobiano por lo que es posible que estas cepas también posean otras BLEE o AmpC las cuales no fueron evaluados en este estudio pero que tendrían una actividad sobre cefalosporinas de segunda y tercera generación y por lo tanto, también tendría actividad sobre cefalosporinas de primera generación como lo es la cefalotina.^{31,80} Esto es un problema al momento de optar por un tratamiento, si se confía en este resultado y no se toman en cuenta factores como estos.^{73, 80}

Un ejemplo de la gama de mecanismos de resistencia, puede verse dentro de la resistencia a amoxicilina con ácido clavulánico, que es comúnmente utilizado en los tratamientos. Este antimicrobiano puede ser ineficaz contra enterobacterias debido a: una hiperproducción de betalactamasas de clase A como TEM-1 y AmpC, betalactamasas resistentes a los inhibidores como los son los de la clase TEM y

OXA o betalactamasas de espectro extendido (BLEE).^{81, 82} Adicionalmente las combinaciones de estos mecanismos son posibles. Mientras que la mayoría de los mecanismos de resistencia descritos dan como resultado una susceptibilidad reducida a un antibiótico, algunos lo hacen solo cuando las bacterias se exponen repetidamente a un antibiótico, por ejemplo la resistencia inducible de AmpC en *Enterobacter* y *Citrobacter*, la cual les confiere resistencia a antimicrobianos como los son penicilinas, cefamicinas, oximincefalosporinas y monobactams, pero no son activas frente a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos, incluso no se ven afectadas por inhibidores como el ácido clavulánico en casos de una alta producción de esta enzima.^{81, 82, 83,84} En el caso de las cepas 29, 31, 32, 33, 35, A, H, y J las cuales corresponde a estos géneros bacterianos, en este estudio mostraron una susceptibilidad a la amoxicilina con ácido clavulánico en el antibiograma, contemplando lo ya mencionado se tendría que valorar si al momento de emitir un tratamiento este realmente sea eficaz para tratar la infección o se deberá prescindir de este. Por lo tanto, es probable que no todos los mecanismos de resistencia para el tratamiento de infecciones sean relevantes para la profilaxis que normalmente se prescribe como dosis única.⁸¹

Como se muestra en la tabla 11 en el caso de las cepas 2, 3, 18, 21, E y F, las cuales fueron resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico, también presentaban blaTEM-1, sin embargo esta enzima se ve inhibida por el ácido clavulánico, como se asume sucedió en el caso de las cepas 30 y 32, ahora bien, una hiperproducción de TEM-1 puede conferirle resistencia y no verse afectada por el inhibidor, hecho que pudo haber ocurrido en estos casos.^{84,85,86,87,88,89}

Por otro lado se observa una resistencia en algunas cepas a cefalosporinas de segunda y tercera generación. Si bien, esto se puede deber a otras BLEE como SHV, CTX y OXA u otros mecanismos de resistencia, es preocupante el hecho de que el gen blaTEM-1, que codifica la betalactamasa TEM-1, solo necesita unos pocos polimorfismos específicos de un solo nucleótido para evolucionar a un gen que codifique para una betalactamasa de espectro extendido (BLEE), que podría degradar todas las cefalosporinas de espectro extendido, incluida la ceftriaxona por

lo que no se descarta la posibilidad de que la cepas que presentan blaTEM-1 pudieran haber generado esas mutaciones y ser la responsable de generar resistencia a las demás cefalosporinas.^{90,91,92}

Es importante la identificación de BLEE ya que son un peligro, debido a que están asociadas a plásmidos y puede haber diseminación entre especies de estos elementos genéticos móviles. Además, estos pueden portar genes de co-resistencia a otros antibióticos tales como aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y trimetoprima sulfametoxazol.⁹³ La selección de antibióticos para tales aislados se convierte así en un desafío terapéutico. El uso clínico de betalactámicos de amplio espectro ha dado lugar a un marcado aumento en la incidencia de bacterias Gram negativas productoras de BLEE.^{93, 94,95}

Se debe resaltar que la cepa 27 de *Escherichia coli* fue resistente a la mayoría de los betalactámicos evaluados a excepción de la amoxicilina con ácido clavulánico, pero siendo la única cepa que fue resistente al imipenem, antimicrobiano que se ha utilizado como tratamiento en cepas multirresistentes, resulta ser trascendente debido a que desde el año 2000, ha aumentado el número de especies bacterianas portadoras de BLEE, y se han notificado en todo el mundo aislados de *E. coli* y otras enterobacterias con la capacidad de producir estas enzimas que hidrolizan todos los agentes betalactámicos, excepto carbapenémicos los cuales han sido cada vez más utilizados como consecuencia de esto.^{96,97} Esto a su vez, provocó un aumento en el número de aislados bacterianos clínicos que producen betalactamasas que tienen la capacidad de hidrolizar los carbapenémicos conocidas como carbapenemasas.⁹⁸

Se han documentado 3 mecanismos principales por los que se genera resistencia a los carbapenémicos: reducción de porinas que evitan la absorción del antimicrobiano, bombas de expulsión y por carbapenemasas.^{99, 100} Estas últimas representa un problema serio, ya que estas inactivan a la mayoría de los betalactámicos y es probable que este fenómeno se haya presentado por la cepa 27 de *E. coli*, como sugieren los resultados obtenidos ya que esta cepa, como se observó, fue resistente a la mayoría de los betalactámicos, incluyendo las

cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación evaluadas en este trabajo. Además las carbapemenasas están codificadas por genes transportados por transposones, plásmidos u otros elementos móviles, que pueden transferirse horizontalmente a otras especies bacterianas.^{99, 101}

Las carbapemenasas, según sus estructuras moleculares, pertenecen a tres clases de betalactamasas; la clase A, B y D. La clase A y D poseen un residuo de serina en el sitio activo para facilitar la apertura del anillo, por lo que se denominan serina betalactamasas sin embargo se ven afectadas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y/o tazobactam,⁹⁹ lo cual significaría, que la cepa 27 podría poseer alguna de estas enzimas, ya que fue únicamente sensible a la amoxicilina con ácido clavulánico.^{99,102} Por otro lado la clase B comprende metalo-betalactamasas, cuyo sitio activo utiliza iones de zinc para mediar en la hidrólisis de enlaces y estas no se ven afectadas por estos inhibidores, lo que sugiere que este tipo de enzima no sea la causante de esta resistencia en esa cepa.⁹⁹

Como ya se ha mencionado, las betalactamasas AmpC sobrepresadas, pueden ocasionar resistencia a monobactámicos como el imipenem, sin embargo, también tendrían efecto sobre betalactámicos combinados con inhibidores, como la amoxicilina con ácido clavulánico y siendo que esta cepa fue susceptible a este antimicrobiano, se podría descartar a esta enzima como mecanismo de resistencia.¹⁰³

Otro grupo de antimicrobianos que con mayor frecuencia se utilizan hoy en día para tratar infecciones ocasionadas por Gram negativos son las quinolonas, de los cuales el ácido nalidíxico, ciprofloxacina y norfloxacina fueron evaluados y por otra parte, se buscó amplificar los genes *aac(60)-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* involucrados en algunos de los múltiples mecanismos de resistencia a estos fármacos. Los sistemas de resistencia a estos antimicrobianos pueden dividirse en a) los que están codificados en genes cromosómicos, que incluyen las modificaciones en los sitios blanco de antibiótico o los sistemas de expulsión y b) aquellos que están codificados por genes presentes en plásmidos, que incluyen a las proteínas Qnr y la enzima

aminoglucósido acetil transferasa modificada, algunos de ellos evaluados en este trabajo.¹⁰⁴

Ahora bien, seguido de *blaTEM-1*, el gen que con mayor frecuencia se encontró fue *qnrS* en 5 aislamientos (15.15%), detectándose en las cepas 2, 3, 17, 34 y J. Sin embargo los genes *aac (60)-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, no fueron detectados en ninguna de las cepas evaluadas. Cabe señalar que las cepas 2 y 17 fueron resistentes al ácido nalidíxico, siendo la cepa 17 también resistente a la norfloxacin. En el caso de las cepas 3, 34 y J que también presentaban *qnrS* fueron susceptibles a las tres quinolonas evaluadas.

Las proteínas Qnr se identificaron por primera vez en el plásmido pMG252, aislado de una cepa clínica de *K. pneumoniae* resistente a ciprofloxacina, en esta se identificó una proteína de 219 aminoácidos, QnrA, que confiere resistencia a quinolonas.¹⁰⁴ Las proteínas Qnr, pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos, llamada así porque sus miembros contienen un motivo recurrente de cinco aminoácidos en tándem (Ser, Thr, Ala o Val) (Asp o Asn) (Leu o Phe) (Ser, Thr o Arg). Aunque se han identificado más de 500 secuencias que contienen el motivo pentapéptido repetido, se desconoce la función de casi todas ellas. Las secuencias que codifican proteínas Qnr se encuentran ampliamente distribuidas en los genomas de enterobacterias. Además de QnrA, se han estudiado las proteínas QnrB, también de *K. pneumoniae* y QnrS de *S. flexneri*. Se sugiere que las proteínas se unen al complejo ADN-topoisomerasa uniéndose a cada una de sus subunidades, de ese modo impidiendo la unión de las quinolonas, aunque su función real no se ha esclarecido aun.^{104, 105}

Es posible que *qnrS* sea el responsable de que las cepas 2 y 17 fueran resistentes a las quinolonas ya mencionadas, sin embargo se reporta que los mecanismo dados por proteínas Qnr proporcionan un bajo nivel de resistencia en enterobacterias,^{106,107} hecho que también pudo haber ocurrido en las cepas 3, 34 y J dado que poseían *qnrS*, pero fueron susceptibles fenotípicamente a las quinolonas evaluadas.^{106,107} Por otro lado, se ha demostrado que, al menos *in vitro* Qnr protege

a la ADN girasa de *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacina. Esta protección es proporcional a la concentración de Qnr e inversamente proporcional a la concentración de ciprofloxacino.¹⁰⁸ La literatura menciona que en el caso de la adquisición de un plásmido portador de un *qnr* no hará que un microorganismo silvestre sea resistente a las quinolonas de acuerdo a los puntos de corte clínicos del CLSI.¹⁰⁷ Estudios como los de Hopkins *et al.* Mostraron que enterobacterias positivas a Qnr mostraban un fenotipo de susceptibilidad reducida a ciprofloxacina pero susceptibilidad conservada al ácido nalidíxico.^{109, 110}

Eso nos hace proponer la hipótesis de que el patrón de resistencia de alto nivel observado, podría estar relacionado a la presencia de otros mecanismos como mutaciones en el sitio diana o sistemas de expulsión, los cuales no fueron evaluados en este trabajo.

Se ha reportado que en algunos casos, existe la presencia de un determinante de resistencia adicional a las quinolonas como el *acc (6)-Ib-cr* en algunos plásmidos, no obstante este gen también fue evaluado y en ninguna de las cepas fue detectado.^{111, 112} En otros casos, el número de copias y especialmente el nivel de transcripción de los genes *qnr* pueden afectar la resistencia a las quinolonas.^{112, 113}

Los resultados sugieren que los genes *qnr* pueden estar albergados en cepas con patrones de susceptibilidad variable a quinolonas, siendo de gran importancia el hecho de que, en cepas sensibles a los antimicrobianos como el ácido nalidíxico, ciprofloxacina y norfloxacina se demostró la presencia del gen *qnrS* como en las cepas 3, 34 y J, esto revela que las cepas portadoras de este gen son categorizadas como sensibles en el laboratorio microbiológico; por consiguiente, las quinolonas se consideran como una opción terapéutica a nivel clínico. Sin embargo, el uso de estos agentes contra este tipo de cepas, además de representar un posible fracaso terapéutico, va a aportar la presión antimicrobiana necesaria para que se seleccionen cepas con mutaciones cromosómicas.^{114, 115,116}

Algunos autores señalan que las *qnr* confieren resistencia al ácido nalidíxico más no a otras quinolonas.^{117, 118} De esta manera se puede pensar que la cepa 2 la cual fue resistente al ácido nalidíxico y también poseía *qnrS*, se pudo dar este fenómeno, sin embargo la cepa 17, la cual presenta una situación similar, también muestra resistencia a la ciprofloxacina lo que pondría en duda que este mecanismo sea el responsable de esta resistencia, como ya se ha mencionado.

También se reporta que los plásmidos que portan genes que codifican para *qnr*, por lo general también acarrean algún gen que codifique para BLEE como AmpC, CTX o SHC entre otras y esto podría ser una de las razones de la alta frecuencia de resistencia a quinolonas observadas en bacterias productoras de BLEE.^{118,119} Incluso se reporta que *qnr* media la resistencia a quinolonas desde integrones de clase 1, los cuales poseen una región conservada común hacia 3' que contiene el gen *sul1* el que a su vez confiere un bajo nivel de resistencia a sulfonamidas^{120,121} Este gen también se buscó en este trabajo, sin embargo en las cepas en las que se detectó *qnrS* no fue detectado *sul1* ni *sul2*. Lo mismo sucede en el caso de *tetA* el cual también está relacionado a integrones de clase 1 y confiere resistencia a tetraciclinas^{121,122}. En el caso de la cepa 34 se encontraron tanto *qnrS* como *tetA*, un hecho en el que ambos genes se podrían encontrar en el mismo elemento genético.^{121, 122}

Es importante mencionar que las bombas de expulsión como QepA, son mecanismos involucrados en la expulsión de quinolonas como ciprofloxacina y norfloxacina y que pudieran ser responsables de la resistencia en cepas donde no se encontró algunos de los genes probados en este trabajo y que podrían conferir resistencia a esos antimicrobianos, pero que si mostraban resistencia fenotípica a las tres quinolonas usadas como son las cepa 1 y 18. Estas bombas también pueden expulsar agentes distintos a las quinolonas como lo son las tetraciclinas, incluso se ha documentado el hallazgo de plásmidos que poseen genes de resistencia a aminoglucósidos que tal vez esté presente en alguna de las cepas que

presentaron una resistencia fenotípica a tetraciclinas o aminoglucósidos y donde no se encuentre un gen específico que les genere esta capacidad.^{123, 124}

Con relación a los aminoglucósidos, de los cuales se usaron la gentamicina, kanamicina y amikacina para evaluar la respuesta fenotípica y la presencia de los genes *strA* y *aadA2*, estos antimicrobianos se consideran unos de los ideales para combatir infecciones ocasionadas por enterobacterias como lo son *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp y *Yersinia* sp, debido a la elevada resistencia que se presenta hacia antimicrobianos como las quinolonas y betalactámicos.^{125,126} Varios de estos géneros fueron aislados en este trabajo, presentando resistencia a los aminoglucósidos en donde los mecanismos involucrados incluyen modificación enzimática, modificación del sitio diana a través de una enzima o mutación cromosómica y expulsión del fármaco.^{125,126}

La modificación enzimática es uno de los principales mecanismos que están involucrados en la resistencia a los aminoglucósidos, también son de gran importancia debido a que los genes que confieren esta capacidad, se encuentran dentro de plásmidos que contienen múltiples elementos de resistencia como betalactamasas.³⁶ Se han reportado más de 100 enzimas modificadoras de estos medicamentos y se clasifican en tres grupos según su capacidad de acetilar, fosforilar o adenilar grupos amino o hidroxilo.^{36,126} Estas modificaciones disminuyen la afinidad de unión del fármaco por su objetivo y conducen a una disminución de la efectividad antimicrobiana,¹²⁷ las cuales incluyen aminoglucósidos N-acetiltransferasas (ACC) aminoglucósidos O-Nucleotidiltransferasa (ANT) y aminoglucósidos O-fosforotransferasas (APH).³⁶

Como se mencionó antes, también se buscó el gen *aac(60)-Ib-cr*, el cual codifica a una ACC y que tiene relación con resistencia a quinolonas, sin embargo no fue detectado en ninguna de las cepas evaluadas. Por otro lado *strA* y *aadA2* que codifican para una APH y una ANT respectivamente si fueron detectados en al

menos una cepa. De esta manera *strA* se encontró en tres cepas (9.09%) y *aadA2* en una cepa (3.03%)

En el caso de *strA*, se detectó en las cepas 19, 20 y F, de las cuales en las cepas 20 y F se observó una resistencia fenotípica a los tres aminoglucósidos evaluados y en la 19 únicamente a la kanamicina. Este gen se encuentra altamente relacionado con la resistencia a la estreptomina y es de particular interés para los análisis de la ecología de la resistencia a los antibióticos, debido a que se distribuye entre los aislados bacterianos de humanos, animales y plantas.¹²⁸ Además estas APH son de interés clínico ya que confieren resistencia a la mayoría de los aminoglucósidos usados clínicamente como la gentamicina^{33,129}. Por otro lado, la resistencia a kanamicina y amikacina se da también principalmente modificaciones enzimáticas dadas por aminoglucósidos O- fosotransferasas (APH).^{127, 129,130} Si bien esta modificación enzimática dada por las APH puede ser la responsable de la resistencia a los antimicrobianos probados, no se descartaría la posibilidad de que otros genes de resistencia estuvieran involucrados, inclusive otros mecanismos como los son las bombas de expulsión.¹²⁶

Es relevante que *strA* se encuentre relacionado a transposones y estos a su vez en plásmidos que a menudo están también vinculados con genes de resistencia a sulfonamidas como *sul1*.^{130, 131} En el caso de la cepa 20 donde a parte de detectarse *strA*, también se detectó *sul1* y *sul2* y la cepa F donde también fue detectado *sul1*, podría indicar que se encuentran dentro del mismo elemento genético y su transmisión puede resultar en cepas multirresistentes.^{130, 131}

En el caso de *aadA2* que codifica para una ANT y confiere resistencia a espectinomicina y estreptomina más penicilina¹³², solo fue encontrado en la cepa 1. Si bien estos aminoglucósidos no fueron evaluados en este trabajo, la importancia de este gen radica en que se ha encontrado dentro de integrones que se encuentran en plásmidos y que a su vez pueden poseer otros genes de resistencia a otros antimicrobianos.^{133, 134} En la cepa 1 de este trabajo además de detectarse *aadA2*,

también se detectaron *sul1* y *tetA*. De acuerdo a la literatura, los casetes donde se encuentra *aadA2* están estrechamente relacionados y están ubicados dentro de integrones de multiresistencia, estos casetes genéticos se encuentran entre los más prevalentes en integrones de clase 1 e integrones de clase 2 y es donde se encuentran genes de resistencia a tetraciclinas y sulfonamidas.^{135, 136}

Resulta difícil relacionar los genes *strA* y *aadA2* con la respuesta fenotípica pues se menciona que los mecanismos enzimáticos se pueden inferir según los resultados que refleje un antibiograma. La presencia de una ACC se sugiere cuando se encuentra resistencia a kanamicina y amikacina, sin embargo, en las cepas que presentaban este patrón no fue detectado el gen *aac(60)-Ib-cr* que codifica para una ACC. Por otro lado, la resistencia a kanamicina pero sensibilidad a la gentamicina es indicativo de una APH₁₃₇ y esto se puede observar en la cepa 19. Una resistencia a kanamicina y a gentamicina serían producidas por una AAC y una ANT respectivamente, sin embargo, en las cepas que presentaban este patrón tampoco fueron detectados los genes que pertenecen a estos mecanismos.¹³⁷

Con respecto a las sulfonamidas fue evaluado el sulfametoxazol con trimetoprim, la combinación se utiliza para tratamientos de diversas enfermedades ocasionadas por Gram negativas, incluyendo infecciones en tracto gastrointestinal, respiratorio, urogenital, en piel, articulaciones y heridas.^{3, 5, 10, 18} Por otra parte los genes de resistencia evaluados fueron *sul1* y *sul2* los cuales codifican variantes de la dihidrepteroato sintetasa (DHPS) que proveen resistencia a estos fármacos. El gen *sul1* fue detectado en las cepas (cepas 1 y 20), siendo en esta última donde también se detectó el gen *sul2*, que también se encontró en la cepa F. Ahora bien, con relación al antibiograma, las cepas 1 y 20 fueron resistente al sulfametoxazol/trimetoprim, sin embargo, la cepa F fue susceptible a este antimicrobiano.

En el caso de las cepas 1 y 20, la resistencia podría deberse a estos genes. Existen varios mecanismos por los cuales pueden verse inhibidos los efectos de estos

antimicrobianos y pueden estar codificados en el cromosoma, plásmidos y transposones.¹³⁸ La resistencia cromosómica se debe a modificaciones o sobreproducción de la enzima diana, la dihidrofolato reductasa (DHFR) y conduce a un bajo nivel de resistencia. Esto explicaría el hecho de que la cepa F fuera susceptible aun teniendo el gen *sul2*, sin embargo, se documenta un alto nivel de resistencia cuando son codificadas por plásmidos o transposones.¹³⁸ La resistencia a las sulfonamidas que se presenta clínicamente en enterobacterias, es transmitida por plásmidos y estas bacterias se ven afectadas por genes que codifican variantes de la DHPS resistentes a fármacos alternativos. Se han caracterizado dos enzimas de este tipo codificadas por estos elementos genéticos y se han determinado las secuencias de los nucleótidos de los dos genes, correspondientes a *sul1* y *sul2* los cuales ya han sido mencionados.¹³⁹

El gen *sul1* se encuentra normalmente ligado a otros genes de resistencia en integrones de clase 1, mientras que *sul2* generalmente se encuentra en plásmidos pequeños no conjugativos o grandes plásmidos que poseen varios genes de resistencia.^{140, 141} Respecto a los integrones de clase 1, están vinculados con genes como *aadA*, como ya se ha mencionado. En este trabajo encontramos que la cepa 1, poseía ambos genes y esta asociación podría deberse a esta razón. Además en un estudio realizado por Han Hiang *et al.* Encontraron que *sul2* era parte de una estructura de casete vinculada con los genes de resistencia a aminoglucósidos como *strA*^{142, 143}, como se asume pueda encontrarse en la cepa 20. También como se ha mencionado con anterioridad, estos genes se encuentran relacionados en elementos genéticos donde albergan genes de resistencia a quinolonas como *qnr*, a betalactámicos como *blaTEM-1* o a tetraciclinas como *tetA* por lo que resulta importante en términos de cepas multirresistentes.

Otro de los antimicrobianos evaluados fue la doxiciclina y como mecanismos de resistencia se evaluaron bombas de expulsión mediante la búsqueda de los genes *tetA* y *tetB*, de los cuales únicamente fue detectado *tetA* en las cepas 1 y 34, siendo también resistentes a la doxiciclina. Este antimicrobiano pertenece al grupo de las

tetraciclinas las cuales poseen un amplio espectro de actividad, que abarca una amplia gama de bacterias incluyendo las Gram negativas¹⁴⁴ existen varios mecanismos que protegen a los patógenos de estos antimicrobianos, siendo uno de los más importantes las bombas de expulsión¹⁴⁵ por lo que es posible que *tetA* sea el responsable de la resistencia en esta cepas.

En el caso de los genes *cat1* y *cmlA* que están relacionados con resistencia a cloranfenicol, así como *mph* y *msr* con relación a la resistencia a macrólidos, no fueron detectados en ninguna de las cepas evaluadas. No obstante, como se mencionó al inicio, los macrólidos no poseen un buen efecto sobre Gram negativos a excepción de la azitromicina.^{68, 69} Esta no fue evaluada en este estudio, sin embargo, los genes *mph* y *msr* se encuentran relacionados con enterobacterias, por lo que resulta de gran interés su detección.¹⁴⁶

En estudios como el de Xin Liu *et al.*¹⁴⁷, donde fueron detectados algunos genes evaluados también en este trabajo, el porcentaje de detección fue más alto como lo fue *bla*_{TEM} (95.8%) *qnrB* (87%) *qnrS* (54.2%) *aac(6')Ib-cr* (83.3%) *cat* (54.2%) *cmlA* (20.8%) y *sul2* (45.8%). Otro estudio hecho por H. Momta *et al.* Los resultados fueron para *tetA* y *tetB* (53.63%) *qnrA* (36.84%) *sul1* (47.36%) y para *cat* y *cmlA* (36.84%). Esto es importante ya que no existen datos en México acerca de la detección de diversos genes asociados a resistencia antimicrobiana y la prevalencia de los mismos, por lo que este estudio proporciona información útil y pionera, sobre todo en medicina veterinaria, para tener una perspectiva sobre la problemática de la resistencia a antimicrobianos en nuestro país, no solo para determinar los mecanismos involucrados, sino también para conocer la epidemiología de los genes de resistencia presentes o detectados con mayor frecuencia. Esto debido a que cepas en las que en el antibiograma presentaron una mayor resistencia a los antimicrobianos utilizados, no se encontró ninguno de los genes como lo es la cepa 27, una cepa de *Escherichia coli* lo que nos hace creer que son más frecuentes otros genes asociados a resistencia que no fueron evaluados en este trabajo.

Es importante observar que aislamientos obtenidos del medio ambiente como la cepa 1, la cual fue aislada de agua de presa que corresponde a un *Citrobacter sp.* fue una en las que se detectó más de un gene de resistencia (*sul2*, *tetA* y *aadA2*) al igual que la cepa 20 aislada de una muestra de hígado que corresponde a una *Escherichia coli* (*sul1*, *sul2* y *strA*). Sin embargo, resulta de gran interés el hecho de que la cepa 1 al ser un microorganismo aislado de muestras ambientales, pueda ser un potencial patógeno tanto de transmisión de enfermedades, como de propagación de genes de resistencia ya que los genes de resistencia a los antibióticos no se limitan a la clínica sino que prevalecen ampliamente en diferentes poblaciones bacterianas en el medio ambiente, como se menciona, la presencia de determinantes de resistencia en bacterias del suelo y ambientales no representa una amenaza para la salud, su movilización hacia nuevos huéspedes y su transferencia a plásmidos e integrones en bacterias patógenas, en este caso a la cepa 1 y 2, puede ser una gran problemática.¹⁴⁸

Como se vio en algunos casos los resultados obtenidos mediante PCR para determinar la resistencia, revelan una discrepancia con los resultados del antibiograma, es por eso que resulta de gran importancia la interpretación de los mismos, ya que los análisis de los resultados fenotípicos se fundamentan en el conocimiento de los diferentes mecanismos de resistencia y su expresión. Por este motivo, se debe tener presente que el objetivo principal de la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana, es evitar una falla en la terapéutica. Debido a esto es de suma importancia, una interpretación adecuada del antibiograma. El comité European Commite of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST por sus siglas en inglés) ha recopilado de manera sistemática y ha publicado un conjunto de reglas o acciones (reglas de experto) que deben llevarse a cabo como respuesta ante un resultado en una prueba de sensibilidad. Las evidencias clínicas y su traducción en reglas de experto podrían, en un futuro, hacer que se modifiquen nuevamente las interpretaciones de CMI categorizadas como sensibles por puntos de corte en microorganismos que además pertenecen a la población silvestre (CMI menor del punto crítico de sensibilidad y del *epidemiological cut-offs* ECOFF o “cortes epidemiológicos”).^{148, 149}

Se menciona que la utilización exclusiva de las categorías clínicas (sensibles o resistentes) puede limitar la interpretación del antibiograma, en particular si los puntos de corte clínicos no son adecuados o están alejados de los puntos de ECOFF. Esta circunstancia se agrava cuando se consideran mecanismos de resistencia de baja expresión que implican valores de CMI o halos de inhibición que apenas superan los puntos de corte de sensibilidad establecidos.¹⁴⁹

La resistencia a los antibióticos es antigua y el resistoma es un problema dinámico y creciente. Las causas del resistoma global se debe a factores como como el aumento de la migración global, el mayor uso de antibióticos sobre todo en clínicas, hospitales y producción animal, la presión de selección, pobre saneamiento, un sistema de eliminación de alcantarillado deficiente, entre otros. Sin embargo el uso irracional de antibióticos, es un factor predisponente asociado con la aparición de resistencia a los antibióticos.

Es importante recordar que respecto a estos casos clínicos cuando los animales manifestaban signos de enfermedad se hacían uso de antimicrobianos tales como: penicilina, ceftriaxona, tetraciclina, florfenicol, amikacina, estreptomicina gentamicina, así como la combinación de algunos de estos como lo son un betalactámico con un aminoglucósido, finalmente cuando el problema infeccioso no se resolvía se implementaba el uso de antimicrobianos como imipenem o cefepime. Esto resulta importante ya que puede ser la causa de la baja resistencia a cierto grupo de antibióticos, así como la moderada o alta resistencia hacia otros. Como bien los vemos hacia grupo de los betalactamicos y aminoglucósidos, estos aislamientos presentaron un moderado a alto porcentaje de resistencia, dentro de este grupo de antimicrobianos usados en cuando los animales manifestaban signos de infección fueron la penicilina, ceftriaxona, cefepime e imipenem. Con respecto a la ceftriaxona se observó resistencia en el 45% de las cepas, en el caso de cefepime el 21% e imipenem un 3%. Si bien más del 50% de las cepas fueron sensibles a estos medicamentos es importante hacer notar que estos son medicamentos de última elección en casos donde el problema no se resuelva y el agente infeccioso no sea sensible a otros antibióticos de primera elección. En el caso de los

aminoglucósidos con respecto a la amikacina se observó una resistencia en el 24% de los aislamientos en la gentamicina en un 57%. Aquí se observa una diferencia importante con respecto a una mayor sensibilidad a la amikacina. Esto posiblemente a que en la práctica clínica equina la gentamicina sea más utilizada que la amikacina¹⁵³, contemplando que las modificaciones enzimáticas son el principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos³⁶, se menciona que se puede inferir que la presencia de algunas enzimas como una ACC pueda estar presente cuando se observe un perfil de resistencia a la amikacina o una ANT en el caso de resistencia a la gentamicina¹³⁷, pensando que estos grupos de enzimas posean un alto grado de especificidad a cierto aminoglucósido, se plantea la hipótesis de que el uso frecuente de la gentamicina promoviera la transferencia de genes de resistencia que codifican enzimas como una ANT y que esto sea la causa del alto porcentaje de resistencia que se observa a este antimicrobiano con respecto a la amikacina, ya que como bien se sabe las bacterias tienen esta capacidad de adaptabilidad en presencia de agentes antimicrobianos, en gran parte a la adquisición de genes de resistencia.¹⁵⁴

Ahora bien, un grupo muy importante de antibióticos que no se empleaban como parte del tratamiento dada la edad de los animales, fueron las quinolonas, esto debido al efecto que se produce en las articulaciones (artropatías) que soportan el peso del animal en desarrollo o inmaduro.¹⁵⁵ Como se observa nuevamente en la gráfica 3 con respecto a las quinolonas se observó una resistencia a al ácido nalidíxico en el 27% de los aislamientos, y en un 15% a la ciprofloxacina y norfloxacina. Este fue el único grupo de antibióticos en donde se observó una mayor sensibilidad y esto debido a la limitación de su uso ya que se menciona en caso contrario, el uso continuo de las quinolonas ha llevado a una mayor resistencia a estos antimicrobianos dada por modificaciones en el sitio blanco, expresión de sistemas de expulsión, proteínas de protección del sitio blanco o enzimas modificadoras.^{104, 106, 119}

Conclusiones

Se obtuvo el perfil fenotípico mediante la técnica de difusión en disco de 33 aislamientos pertenecientes a enterobacterias.

Se estandarizó la PCR para la detección de genes asociados a resistencia a diferentes familias de antibióticos y de esta manera obtener el perfil genotípico.

Los genes *bla*_{TEM-1}, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *strA*, *aadA-2*, y *qnrS*, fueron detectados en al menos una muestra.

Los genes *cat*, *cmlA*, *tetB*, *aac (60)-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *mph* y *msr* no fueron detectados en ninguno de los aislamientos evaluados.

Existe una relación en el perfil fenotípico y genotípico en el 72.7% de los casos.

En aislamientos obtenidos de muestras ambientales como agua de presa y de pradera se detectaron genes de resistencia a betalactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglucósidos y quinolonas.

En este trabajo se hace el primer reporte de genes asociados a resistencia en enterobacterias aisladas de casos clínicos de caballos a diferentes grupos de antimicrobianos y se realizó una asociación con su perfil fenotípico.

Prospectiva

Detectar genes asociados a BLEE y AmpC que confieren resistencia a betalactámicos.

Detectar carbapenemasas en la cepa 27 tipo (IMI) (GES) (OXA) (KPC)

Detectar mutaciones en *gyrA* encaminada a una resistencia a quinolonas mediante secuenciación en cepas en las que se presentó una resistencia en al menos una de las 3 quinolonas evaluadas.

Buscar otros genes asociados a resistencia a diferentes familias de antibióticos como *dfr*, *floR*, *rmtC*, *armA* y otros genes tipo Tet

10 Referencias

- 1 Gerard J.Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. Introducción a la microbiología. Buenos Aires Bogotá editorial Medica Panamericana 9 edición; 2007 294:323-24.
- 2 Rock C, Donnenberg MS. Human Pathogenic Enterobacteriaceae [Internet]. Third Edit. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier; 2014. 1–8 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00136-7>
- 3 Nachon H, Bosisio C. Enfermedades Infecciosas De Los Equinos. Area Salud Prod Equinos [Internet]. 2005;28–76. Disponible en: http://www.fvet.uba.ar/fcvanterior/equinos/enferm_infecc_de_los_equinos-101012.pdf
- 4 Lopardo HA, Predari SC, Vay C. Bacterias de importancia clínica. Man Microbiol Clínica la Asoc Argentina Microbiol [Internet]. 2011;1:11–73. Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
- 5 Cortés-Delgadillo F de J. Terapia con antimicrobianos en equinos. Rev Sanid Milit Mex [Internet]. 2007;61(1):45–54. Disponible en: www.medigraphic.com.
- 6 Criollo KG. Todo lo que debes saber sobre el uso incorrecto de los antibióticos por parte del paciente... ¡Y del médico! Elsevier [Internet]. 2017; Disponible en: <https://www.elsevier.es/corp/generacionelsevier/lo-debes-saber-uso-incorrecto-los-antibioticos-parte-paciente-del-medico/>
- 7 Cholvi M. La automedicación con antibióticos puede provocar una epidemia de “superbacterias.” Elsevier [Internet]. 2017; Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/actualidad-sanitaria/la-automedicacion-con-antibioticos-puede-provocar-una-epidemia-de-superbacterias>
- 8 Rubio Javier. #ElsevierTalks “La resistencia a los antimicrobianos está amenazando al control y tratamiento de un gran número de enfermedades en todo el mundo.” 2017; Disponible en: <https://www.elsevier.com/es->

- es/connect/medicina/elseviertalks-la-resistencia-a-los-antimicrobianos-esta-amenazando-al-control-y-tratamiento-de-un-gran-numero-de-enfermedades-en-todo-el-mundo
- 9 Rubio J. “Las bacterias resistentes se generan por un proceso de selección natural.” 2017; Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/las-bacterias-resistentes-se-generan-por-un-proceso-de-seleccion-natural>
 - 10 Aktories K. How to Overcome the Antibiotic Crisis - Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives. Vol. 398, Current Topics in Microbiology and Immunology. 2016. 3–33 p
 - 11 FAO. El Plan De Acción De La Fao Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos 2016-2020. 1 [Internet]. 2016;1. Disponible en: <http://www.fao.org/3/b-i5996s.pdf>
 - 12 Neelanjana Pandey; Marco Cascella. Beta Lactam Antibiotics , Istituto Nazionale Tumori - IRCCS - Fondazione Pascale, Via Mariano Semmola 80100, Napoli. Italy julio 4 2020 internet <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>
 - 13 J.A. Martínez, F. Sánchez. Mecanismo de acción de los antibióticos. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínic. Barcelona. España, 2007
 - 14 Medina J, Paciel D, Noceti O, Rieppi G. Actualización acerca de colistina (polimixina E). Rev Médica del Uruguay [Internet]. 2019;33(3 SE-Trabajos de Revisión o Actualización y Puestas al día):195–206. Disponible en: <http://revista.rmu.org.uy/ojsrmu311/index.php/rmu/article/view/101>
 - 15 Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(1):44–52.
 - 16 O’Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016; Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
 - 17 Torreón U. Universidad Autónoma de Coahuila Facultad de Medicina. 2011;(January 2016):1–36.

- 18 C Reygaert W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):482–501.
- 19 Cesur S, Demiröz AP. Antibiotics and the Mechanisms of Resistance to Antibiotics. *Med J Islam World Acad Sci.* 2013;21(4):138–42.
- 20 Pilar Sánchez-B Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Spei Domus.* 2012;8(17):31-37
- 21 Blakely GW. Mechanisms of Horizontal Gene Transfer and DNA Recombination [Internet]. Vols. 1–3, *Molecular Medical Microbiology: Second Edition.* Elsevier Ltd; 2014. 291–302 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00015-9>
- 22 Chaves AG, Ordóñez A. Recombinación en bacterias. Transformación. Conjugación. Transducción generalizada. *Agro* [Internet]. 2016;1–8. Disponible en: <http://www.agro.unc.edu.ar/~wpweb/genetica/wp-content/uploads/sites/12/2016/11/CAPÍTULO-16-.-RECOMBINACIÓN-EN-BACTERIAS.pdf>
- 23 Acharya Tankeshwar. Gene Transfer Mechanism in Bacteria and It's types.(internet) Nepal. Agosto 2022. Disponible en: <https://microbeonline.com/key-information-regarding-gene-transfer-mechanism-bacteria/>
- 24 Moreno C, González R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello.* 2009;69(2):185–92.
- 25 M. Munita J. A. Arias C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 2016; 4 (2)
- 26 Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2015;13(1):42–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- 27 Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. Vol. 56, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2005. 20–51 p.
- 28 Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*

- [Internet]. 2014;453(2):254–67. Disponible en :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
- 29 Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(5):525–33.
 - 30 Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037–50.
 - 31 Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*. 2019;39:199–220.
 - 32 Golkar T, Zielinski M, Berghuis AM. Look and outlook on enzyme-mediated macrolide resistance. *Front Microbiol*. 2018;9(AUG):1–15.
 - 33 Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(10):1451–70.
 - 34 Röttig A, Steinbüchel A. Acyltransferases in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;77(2):277–321.
 - 35 Wangkheimayum J, Bhattacharjee M, Das BJ, Melson Singha K, Chanda DD, Chanda D, et al. Diverse aminoglycoside phosphotransferase types conferring aminoglycoside resistance in Enterobacteriaceae: A single-centre study from Northeast India. *Indian J Med Microbiol [Internet]*. 2019;37(3):418–22. Disponible en: https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_19_262
 - 36 Ramirez Maria S. Tolmaski Marcelo E. Aminoglycoside Modifying Enzymes California. Elsevier. 2010; 13(6):151-171
 - 37 López-Velandia DP, Torres-Caycedo MI, Prada- Quiroga CF. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Rev Univ. Salud*. 2016;18(1):190-202
 - 38 Baquero F, Martínez JL. MINIREVIEW Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1771–7.
 - 39 Tomlinson JH, Thompson GS, Kalverda AP, Zhuravleva A, O'Neill AJ. A target-protection mechanism of antibiotic resistance at atomic resolution: Insights into FusB-type fusidic acid resistance. *Sci Rep*. 2016;6(January):1–12.

- 40 Wilson DN, Haurlyuk V, Atkinson GC, O'Neill AJ. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(11):637–48.
- 41 Zoe Hughes Antibiotic Resistance: A continuing Threat we can no Longer ignore. Ausmed Education Pty Ltd (ABN: 33107 354 441) 2022. Disponible en: <https://www.ausmed.com/cpd/articles/what-is-antibiotic-resistance>
- 42 Juan J. Picazo. Procedimientos en microbiología clínica Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. España 2000
- 43 Peterson. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. 1992. 248 p.
- 44 Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica Mex.* 2009;51(SUPPL.3):439–46.
- 45 World Health Organization. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance, World Health Organisation. WHO Glob Strateg Contain Antimicrob Resist [Internet]. 2001;WHO/CDS/CS:1–105. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/66860>
- 46 Agnė Giedraitienė, Astra Vitkauskienė. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria, Lithuanian University of Health Sciences 2011
- 47 World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2012.
- 48 World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2014
- 49 Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services. Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta: CDC; 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- 50 ECDC/EMEA. Joint Technical Report. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents 2009. 2009. 1–54 p.
- 51 Plan Universitario para el Control de Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) UNAM. Recomendaciones para el control de la resistencia antimicrobiana en

- México. 2019;19–35.
- 52 Jang S. S.; A Diagnostic Manual of Veterinary Clinical Bacteriology and Mycology 1986, Universidad de Davis, California, III, p 48-78
- 53 Barrow G. I, Feltham R. K. A.; Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 1987. 7 p128- 149 Cambridge University.
- 54 W. BAUER, W. M. M. KIRBY, J. C. SHERRIS, AND M. TURCK Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method American Journal of Clinical Pathology, 45:493–496. Copyright © 1966 by the American Society of Clinical Pathologists.
- 55 [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute 2018, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed
- 56 Pitcher DG, Saunders N. a, & Owen , R.J. Rapid extraction of bacteria genomic DNA whit guanidium thiocyanate, Letters in Aplied Microbiology,. (1989). 151-156. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- 57 Sambrook J., Fritsh EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning a Laboratory Manual, 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 58 Prasertsee T, Khantaprab N, Yamsakul P, Santiyanont P, Chokesajjawatee N, Patchanee P. Repetitive sequence-based PCR fingerprinting and the relationship of antimicrobial-resistance characteristics and corresponding genes among Salmonella strains from pig production. Asian Pacific J Trop Dis [Internet]. 2016;6(5):390–5. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)61054-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61054-4)
- 59 Adesiji YO, Shivakumaraswamy SK, Deekshit VK, Kallappa GS, Karunasagar I. Molecular characterization of antimicrobial multi-drug resistance in non-typhoidal Salmonellae from chicken and clam in Mangalore, India. J Biomed Res. 2018;32(3):237–44.
- 60 Odoch T, Sekse C, L'abee-Lund TM, Hansen HCH, Kankya C, Wasteson Y. Diversity and antimicrobial resistance genotypes in non-typhoidal Salmonella isolates from poultry farms in uganda. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(2).
- 61 Majlesi A, Kakhki RK, Mozaffari Nejad AS, Mashouf RY, Roointan A, Abazari

- M, et al. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae strains in Hamadan, West of Iran. Saudi J Biol Sci [Internet]. 2018;25(3):426–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.11.019>
- 62 Rose S, Desmolaize B, Jaju P, Wilhelm C, Warrass R, Douthwaite S. Multiplex PCR to identify macrolide resistance determinants in *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(7):3664–9.
- 63 R. PODSCHUN*, AND, U. ULLMANN. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens. 1998;11(4):589–603. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy-ub.rug.nl/pmc/articles/PMC88898/pdf/cm000589.pdf>
- 64 Toro LME, Correa JCC. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: Epidemiología y resistencia. Iatreia. 2010;23(3):240–9.
- 65 Dalben M, Varkulja G, Basso M, Krebs VLJ, Gibelli MA, van der Heijden I, et al. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. J Hosp Infect. 2008;70(1):7–14.
- 66 Samonis G, Karageorgopoulos DE, Kofteridis DP, Matthaiou DK, Sidiropoulou V, Maraki S, et al. *Citrobacter* infections in a general hospital: Characteristics and outcomes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(1):61–8.
- 67 Ríos-Tobón S, Agudelo-Cadavid RM, Gutiérrez-Builes LA. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Rev Fac Nac Salud Pública. 2017;35(2):236–47.
- 68 Daza D. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Información Terapéutica del Sist Nac Salud [Internet]. 1998;22(3):57–67. Disponible en : <http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- 69 Galas M, WHONET R. Grupo Kes. Serv ANTMICROBIANOS [Internet]. 2000;52. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/Grupo-KES-boletin-13.pdf>
- 70 Thakuria B, Lahon K. The beta lactam antibiotics as an empirical therapy in a developing country: An update on their current status and recommendations to counter the resistance against them. J Clin Diagnostic Res. 2013;7(6):1207–

- 14.
- 71 Chandel AK, Rao LV, Narasu ML, Singh O V. The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. *Enzyme Microb Technol.* 2008;42(3):199–207.
- 72 Oduro-Mensah D, Obeng-Nkrumah N, Bonney EY, Oduro-Mensah E, Twum-Danso K, Osei YD, et al. Genetic characterization of TEM-type ESBL-associated antibacterial resistance in Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Ghana. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15(1):1–9.
- 73 Bush K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2001;32(7):1085–9.
- 74 Obeng-Nkrumah N, Twum-Danso K, Krogfelt KA, Newman MJ. High levels of extended-spectrum beta-lactamases in a major teaching hospital in Ghana: The need for regular monitoring and evaluation of antibiotic resistance. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(5):960–4.
- 75 Anna Baraniak, et al. Evolution of TEM-Type Extended-Spectrum -Lactamases in Clinical Enterobacteriaceae Strains in Poland.
- 76 Leflon-Guibout V, Heym B, Nicolas-Chanoine MH. Updated sequence information and proposed nomenclature for bla(TEM) genes and their promoters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(11):3232–4.
- 77 Lin CF, Hsu SK, Chen CH, Huang JR, Lo HH. Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. *J Med Microbiol.* 2010;59(6):665–71.
- 78 González AC, Nieves B, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Moreno M. Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Rev Chil Infectol.* 2013;30(4):374–80.
- 79 Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Distribution of the blaTEM gene and blaTEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(4):745–51.
- 80 Seral C, José Gude M, Javier Castillo F. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (Pampc ó cefamicinasas): Origen, importancia, detección y

- alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter*. 2012;25(2):89–99.
- 81 Kirby A, Santoni N. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: What impact on the efficacy of antibiotic prophylaxis in colorectal surgery? *J Hosp Infect* [Internet]. 2015;89(4):259–63. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.016>
- 82 Alfaro Rojas C. Revisión de la bibliografía sobre AmpC: una importante beta-lactamasa. *Rev Médica del Hosp Nac Niños Dr Carlos Sáenz Herrera*. 2005;40(2):59–67.
- 83 Jones RN, Baquero F, Privitera G, Inoue M, Wiedemann B. Inducible β -lactamase-mediated resistance to third-generation cephalosporins. *Clin Microbiol Infect*. 1997;3(SUPPL. 1):s7–20.
- 84 Seral C, José Gude M, Javier Castillo F. Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (Pampc ó cefamicinasas): Origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Rev Esp Quimioter*. 2012;25(2):89–99.
- 85 Wu PJ, Shannon K, Phillips I. Effect of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(3):494–8.
- 86 Sanders CC, Iaconis JP, Bodey GP, Samonis G. Resistance to ticarcillin-potassium clavulanate among clinical isolates of the family Enterobacteriaceae: Role of PSE-1 β -lactamase and high levels of TEM-1 and SHV-1 and problems with false susceptibility in disk diffusion tests. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(9):1365–9.
- 87 Reguera JA, Baquero F, Perez-Diaz JC, Martinez JL. Synergistic effect of dosage and bacterial inoculum in TEM-1 mediated antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988;7(6):778–9.
- 88 Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, Sanchez MB, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2013;4(APR):1–15.
- 89 Stapleton P, Wu PJ, King A, Shannon K, French G, Phillips I. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(11):2478–83.

- 90 Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(9):1697–704.
- 91 Muhammad I, Golparian D, Dillon JAR, Johansson Å, Ohnishi M, Sethi S, et al. Characterisation of bla TEM genes and types of β -lactamase plasmids in *Neisseria gonorrhoeae* - the prevalent and conserved bla TEM-135 has not recently evolved and existed in the Toronto plasmid from the origin. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):1–7.
- 92 Huang W, Palzkill T. A natural polymorphism in β -lactamase is a global suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(16):8801–6.
- 93 Shakil S, Ali SZ, Akram M, Ali SM, Khan AU. Risk factors for extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. *J Trop Pediatr.* 2009;56(2):90–6.
- 94 Haque SF, Ali SZ, TP M, Khan AU. Prevalence of plasmid mediated bla TEM-1 and bla CTX-M-15 type extended spectrum beta-lactamases in patients with sepsis. *Asian Pac J Trop Med [Internet].* 2012;5(2):98–102. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60003-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60003-0)
- 95 Ma L, Lin CJ, Chen JH, Fung CP, Chang FY, Lai YK, et al. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes armA and rmtB in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):104–11.
- 96 Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* 17(10), 1791–1798 (2011).
- 97 Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol [Internet].* 2015;13(1):42–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- 98 Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(4):682–707.
- 99 Elshamy AA, Aboshanab KM. A review on bacterial resistance to carbapenems: Epidemiology, detection and treatment options. *Futur Sci OA.* 2020;6(3).
- 100 Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms

- disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(4):659–67.
- 101 Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):15–21.
- 102 Jacoby GA, Munoz-Price LS. Mechanisms of disease: The new β -lactamases. *N Engl J Med.* 2005;352(4):380–91.
- 103 Bassetti M, Righi E, Viscoli C. Novel β -lactam antibiotics and inhibitor combinations. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17(3):285–96.
- 104 Víctor M. Chávez-Jacobo et. al Resistencia bacteriana a quinolonas: determinantes codificados en plásmidos 2015
- 105 Jacoby GA, Corcoran MA, Hooper DC. Protective effect of qnr on agents other than quinolones that target DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(11):6689–95.
- 106 Doma AO, Popescu R, Mitulețu M, Muntean D, Dégi J, Boldea M V., et al. Comparative evaluation of qnrA, qnrB, and qnrS genes in Enterobacteriaceae ciprofloxacin-resistant cases, in swine units and a hospital from western Romania. *Antibiotics.* 2020;9(10):1–12.
- 107 Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664–89.
- 108 Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5638–42.
- 109 Hopkins KL, Day M, Threlfall EJ. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom [3]. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):340–2.
- 110 Hopkins KL, Wootton L, Day MR, Threlfall EJ. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(6):1071–5.
- 111 Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Chi HP, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006;12(1):83–8.
- 112 Xu X, Wu S, Ye X, Liu Y, Shi W, Zhang Y, et al. Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA1. *Antimicrob*

- Agents Chemother. 2007;51(11):4105–10.
- 113 Rodriguez-Martinez, J. M., C. Velasco, A. Pascual, I. Garcia, and L. Martinez-Martinez. 2006. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids
- 114 Castanheira M, Pereira AS, Nicoletti AG, Pignatari ACC, Barth AL, Gales AC. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1527–9.
- 115 Minarini LAR, Poirel L, Cattoir V, Darini ALC, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(3):474–8.
- 116 Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):603–8.
- 117 Rodríguez-Martínez M, Pichardo C, García I, Pachón-Ibañez M, Docobo F, Pascual A. Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing *qnrA1*. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 691-7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02020.x
- 118 José García, Dianny Martínez Genes *qnr* en Enterobacteriaceae aisladas en un hospital de Venezuela
- 119 George A. Jacoby Mechanisms of Resistance to Quinolones Lahey Clinic, Burlington, Massachusetts *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:S120–6
- 120 Rodríguez-Martínez JM. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23(1):25–31.
- 121 Kilani H, Ferjani S, Mansouri R, Boutiba-Benboubaker I, Abbassi MS. Occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among *Escherichia coli* strains isolated from animals in Tunisia: Specific pathovars acquired *qnr* genes. *J Glob Antimicrob Resist [Internet].* 2020;20:50–5. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.023>
- 122 Sunde M, Norström M. The prevalence of, associations between and conjugal

- transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(4):741–7.
- 123 Hooper. C. D Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance Massachusetts 2015 September ; 1354(1): 12–31. doi:10.1111/nyas.12830.
- 124 Ruiz J. Transferable mechanisms of quinolone resistance from 1998 onward. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(4):1–59.
- 125 Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. *Aminoglycosides : An Overview.* 2016;
- 126 Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus.* 2018;8(1).
- 127 Llano-Sotelo B, Azucena EF, Kotra LP, Mobashery S, Chow CS. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem Biol.* 2002;9(4):455–63.
- 128 Sundin GW. Distinct recent lineages of the strA-strB streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Curr Microbiol.* 2002;45(1):63–9.
- 129 Woegerbauer M, Zeinzinger J, Springer B, Hufnagl P, Indra A, Korschineck I, et al. Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes aph(39)-IIIa and aph(39)-IIa in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Aust. *J Med Microbiol.* 2014;63(PART 2):210–7.
- 130 Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1993;57(1):138–63.
- 131 G. W. Sundin and C. L. Bender Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Molecular Ecology* 1996, 5, 133-143
- 132 Derby G. B. Michael Identification of an aadA2 Gene Cassette from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005

- Dec;52(10):456-9
- 133 Bito A, Susani M. Revised analysis of aadA2 gene of plasmid pSa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(5):1172–5.
 - 134 Doosti A, Mahmoudi E, Jami MS, Mokhtari-Farsani A. Prevalence of aadA1, aadA2, aadB, strA and strB genes and their associations with multidrug resistance phenotype in *Salmonella Typhimurium* isolated from poultry carcasses. *Thai J Vet Med.* 2016;46(4):691–7.
 - 135 Sunde M, Norström M. The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):87–90.
 - 136 Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolates from Animals in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(3):903–8.
 - 137 Guzmán M, Guzmán F, Salazar E, Albarado L, Rodulfo H, de Donato M. Identificación de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos en cepas intrahospitalarias de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev la Soc Venez Microbiol.* 2016;36(1):10–5.
 - 138 Van Duijkeren, E., Vulto, A.G., van Miert, A.S.J.P.A.M. Trimethoprim/sulfonamide combinations in the horse: a review. *J Vet Pharmacol Ther*; 1994; 17 (1): 64-73
 - 139 Sköld O. Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resist Updat.* 2000;3(3):155–60.
 - 140 Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LMC. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet.* 2001;357(9265):1325–8.
 - 141 Antunes P, Machado J, Sousa J. C, Peixe L. Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* Strains and Relation with Integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Feb; 49(2): 836–839.

- 142 Lacotte, Y., Ploy, M. C., and Raheison, S. (2017). Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME J.* 11, 1535–1544. doi: 10.1038/ismej.2017.3
- 143 Jiang H, Cheng H, Liang Y, Yu S, Yu T, Fang J, et al. Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* Isolates From *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Front Microbiol.* 2019;10(August).
- 144 Grossman TH. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(4):1–24.
- 145 Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(3):205–10.
- 146 Nguyen MCP, Woerther PL, Bouvet M, Andremont A, Leclercq R, Canu A. *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(10):1648–50.
- 147 Liu X, Zhang J, Li Y, Shen Q, Jiang W, Zhao K, et al. Diversity and frequency of resistance and virulence genes in *blaKPC* and *blaNDM* co-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from China. *Infect Drug Resist.* 2019;12:2819–26.
- 148 Van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front Microbiol.* 2011;2(SEP):1–27.
- 149 European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. [consultado 20/12/2010]. Disponible en: URL:<http://www.eucast.org>.
- 150 Cantn R. Interpretive reading of the antibiogram: A clinical necessity. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(6):375–85.
- 151 Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Rasool MH, Nisar MA, Aslam MA, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1645–58.
- 152 Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):15–21.

- 153 Redpath A, Hallowell GD, Bowen IM. Use of aminoglycoside antibiotics in equine clinical practice; a questionnaire-based study of current use. *Vet Med Sci.* 2021;7(2):279–88.
- 154 McDermott PF, Walker RD, White DG. Antimicrobials: Modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol.* 2003;22(2):135–43.
- 155 Sumano López H, Lizárraga Madrigal I, Ocampo Camberos L, Obregón Jurgens K. Reacciones adversas de los fármacos en los equinos. *Vet México OA.* 2020;7(3):1–48.

APENDICE

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
G	Gramos
H	Hora
Kg	Kilogramo
L	Litros
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
min	Minutos
μL	Microlitros
ng	Nanogramos
Pb	Pares de bases
pH	Potencial de Hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
U	Unidades
v/v	volumen/volumen
V	volts
%	Porcentajes

Lista de figuras

Figura 1. Proceso de transformación, transducción y conjugación.....	9
Figura 2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	16
Figura 3. Amplificación del gen de resistencia <i>blaTEM-1</i>	40
Figura 4. Amplificación del gen de resistencia <i>qnrS</i>	40
Figura 5. Amplificación del gen de resistencia <i>strA</i>	41
Figura 6. Amplificación del gen de resistencia <i>aadA-2</i>	41
Figura 7. Amplificación del gen de resistencia <i>tetA</i>	41
Figura 8. Amplificación del gen de resistencia <i>sul1</i>	42
Figura 9. Amplificación del gen de resistencia <i>sul2</i>	42
Grafica 1. Frecuencia y distribución de aislados bacterianos.....	34
Grafica 2. Frecuencia y distribución de los aislamientos a partir de muestras de caballos.....	35
Grafica 3. Frecuencia y distribución de resistencia en enterobacterias.....	37
Grafica 4. Frecuencia y distribución de genes de resistencia en enterobacterias...	39

Lista de cuadros

Cuadro 1. Géneros bacterianos de mayor relevancia en medicina veterinaria.....	2
Cuadro 2. Grupos de antimicrobianos y sus principales representantes.....	6
Cuadro 3. Clasificación de betalactamasas de acuerdo al esquema de Amber y el de Bush-Jacoby-Mendeiros.....	14
Cuadro 4. Ubicación y cantidad de muestras.....	23
Cuadro 5. Controles para la estandarización de la PCR.....	27
Cuadro 6. Identificación y procedencia de las muestras.....	30
Cuadro 7. Indicadores específicos para la identificación de genes de resistencia.....	32
Cuadro 8. Condiciones para la PCR.....	33
Cuadro 9. Patrón de susceptibilidad y resistencia de los aislamientos a los diferentes antibióticos.....	36
Cuadro 10. Genes detectados mediante la PCR.....	38
Cuadro 11. Comparación de la expresión fenotípica y genotípica.....	44

Anexo 1 Medios de cultivo

Caldo Luria Bertani (LB)

Cloruro de Sodio (JT BAKER ®) 10 g

Peptona de caseína (Becton Dickinson®/MCDLab®) 10 g

Extracto de Levadura (Becton Dickinson®) 5 g

Agua destilada 950 mL

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 115 °C

Agar LB

Al preparar caldo LB agregar 15 g de agar-bacteriológico (Difco®/MCDLab®) para 1 L.

Agar sangre

Corazón de res, infusión 500 g

Peptona de caseína 10 g

Cloruro sódico 5 g

Agar 15 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes en 900 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C. Al enfriarse el medio a 45 °C agregar 100 mL de sangre de ovino o bovino o caballo desfibrinada atemperada asépticamente.

Agar MacConkey (McC)

Digerido pancreático de gelatina 17 g

Peptona de carne y caseína 3 g

Lactosa 10 g

Rojo neutro 0.03 g

Cristal violeta 0.001 g

Sales biliares 1.5 g

Agar 13.5 g

Disolver los componentes en 1000 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Agar triple azúcar hierro (TSI)

Digerido pancreático de caseína 10 g

Digerido péptico de tejido animal 10 g

Cloruro sódico 5 g

Lactosa 10 g

Sacarosa 10 g

Glucosa 1 g

Sulfato ferroso de amonio 0.2 g

Tiosulfato sódico 0.2 g

Rojo fenol 0.025 g

Agar 13 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

Medio SIM

Extracto de carne 3 g

Hidrolizado pancreático de gelatina 30 g

Sulfato ferroso amónico 0.2 g

Tiosulfato sódico 0.025 g

Agar 3 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Agar citrato de Simmons

Fosfato de amonio dihidrogenado 1 g

Fosfato dipotásico 1 g

Cloruro sódico 5 g

Citrato sódico 2 g

Sulfato magnésico 0.2 g

Agar 15 g

Azul de bromotimol 0.08 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

Agar urea de Christesen

Hidrolizado pancreático de gelatina 1 g

Dextrosa 1 g

Cloruro sódico 5 g

Fosfato potásico 2 g

Urea 20 g

Rojo Fenol 0.012 g

Agar 15 g

Disolver el agar en 950 mL, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Atemperar el agar a 45 °C, los demás componentes disueltos en 50 mL de agua destilada, esterilizar por filtración incorporando el agar, dispensar en tubos. Enfriar el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

Agar fenilalanina

DL-Fenilalanina 2 g

Extracto de levadura 3 g

Cloruro sódico 5 g

Fosfato sódico 1 g

Agar 12 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los componentes, calentar hasta ebullición, no sobrecalentar, y dispensar en tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Enfriar el tubo de manera que el agar quede en forma inclinada en el tubo.

Reactivos para identificación e interpretación de bioquímicas

Reactivo de Kovac (para detección de indol)

Alcohol isoamílico 150 mL

p-dimetilaminobenzalaldehido 10 g

HCL 50 mL

Disolver le p-dimetilaminobenzalaldehido en el alcohol isoamílico (amílico o butílico), una vez incorporado se agrega el HCL, almacenar el frasco ambar en refrigeración.

Prueba de oxidasa

N, n, n, n-tetrametil-p-fenilendiamina

Impregnar una porción de papel filtro (7cm de diámetro) con 3 gotas de solución acuosa al 1% del reactivo, secar a temperatura ambiente (no secar por completo y congelar a -20 °C).

Cloruro férrico (prueba de fenilalanina)

FeCl₃ 10 g

H₂O 1000 mL

Disolver cuidadosamente el FeCl₃ en el agua destilada. Almacenar en frasco ámbar en refrigeración.

Anexo 2 Soluciones

Soluciones para electroforesis

Amortiguador TRIS-acido-acetico-EDTA (TAE) 50x

Trisaminometano base (Affymetrix USB®) 242 g

Ácido acético glacial (JT Baker®) 57.1 mL

Ácido Etilen Diamino Tetrácetico–EDTA (JT Baker®) 37.2 g o 50 mL a 0.5 M pH 8.0

Aforar a 1 L de agua destilada. Esterilizar por autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Solución de trabajo 1X

Amortiguador borato de sodio (SB) 25x

NaOH (JT Baker®) 25 Mm disolver en agua destilada y ajustar pH con ácido bórico (JT Baker®) A 8.0-8.5.

Esterilizar por autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Solución de trabajo 1X

Amortiguador de carga para ADN

Glicerol o Sacarosa (Sigma-Aldrich®) 30-40 % (w/v)

Xilenciano (Sigma-Aldrich®) 0.25 % (w/v)

Azul de bromocresol (Sigma-Aldrich®) 0.25 % (w/v)

Naranja G (Sigma-Aldrich®) 0.50-0.75 % (w/v)

Esterilizar por autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 121 °C.

Solución de trabajo 1X (Realizar dilución con TAE o SB según sea el caso)

Agarosa con SB 1.5%

Agarosa grado biología molecular (Invitrogen®) 1.5 g

Solución SB 1X 1000 mL

Calentar hasta ebullición y disolución de la agarosa y enfriar hasta 50 °C y vaciar.

Agarosa con TAE 0.8%

Agarosa grado biología molecular (Invitrogen®) 1.5 g

Solución TAE 1X 1000 mL

Calentar hasta ebullición y disolución de la agarosa y enfriar hasta 50 °C y vaciar.

Soluciones para extracción de ADN

Solución de lisis

1.66 M tiocianato de guanidina (Sigma-aldrich®)

N-Sarcosyl (Sigma-Aldrich®) 0.16%

EDTA Na (JT Baker®) pH 8.0 a 0.5 M

Disolver todos los reactivos en agua Mili Q y aforar a 150 mL

Esterilizar por autoclave a 121°C 5 min 15 lb, almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Acetato de amonio 7.4 M

7.4 M Acetato de amonio (JT Baker®) 100 mL

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min 15 lb

Almacenar a -20 °C

Fenol-cloroformo 1:1 v/v

Fenol (Sigma-Aldrich) 25 mL

Cloroformo (JT Baker®) 25 mL

Almacenar en frasco ámbar en refrigeración a 4 °C

Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 v/v/v

Fenol (Sigma-Aldrich) 25 mL

Cloroformo (JT Baker®) 24 mL

Alcohol isoamílico (JT Baker®) 1 mL

Almacenar en frasco ámbar en refrigeración a 4 °C

Etanol 100%

Alcohol etílico absoluto (JT Baker®) 100 mL

Almacenar a -20 °C

Etanol 70%

Etanol etílico absoluto (JT Baker®) 70 mL

H₂O libre de nucleasas 30 mL

Almacenar a -20 °C

Soluciones para extracción de plásmido (Lisis alcalina)

Solución I

50 mM glucosa (BD Bioxon®)

25 mM Tris – HCl pH 8 (Affymetrix USB®)

10 mM EDTA pH 8 (Affymetrix USB®)

Solución II

0.2 N NaOH (JT Baker®)

1 % SDS (Sigma-Aldrich®)

Solución III

5 M Acetato de Potasio (JT Baker®) 60 mL

Ácido Acético Glacial 11.5 mL

Agua Destilada 28.5 mL

Soluciones y reactivos para la PCR

DNTP's (Invitrogen®/Thermo Scientific Fisher®)

ATP 100 mM

CTP 100 mM

GTP 100 mM

TTP 100 mM

Agregar 10µL de cada dinucleótido a 60µL de agua estéril libre de nucleasas, almacenar a -20 °C

Iniciadores (Invitrogen®/Sigma Aldrich®)

Iniciador F (En sentido) 100 µM

Iniciador R (Antisentido) 100 µM

Diluir por separado 10µL de cada iniciador en 90µL de agua libre de ADNasas, almacenar a -20 °C

Polimerasa de *Thermus aquaticus* recombinante (Thermo Scientific Fisher®)

TaqPol 5 U/ μ l

No diluir, si se requiere diluir emplear dimetilsulxido o Polietilenglicol

Almacenar a -20 °C