



Universidad Nacional de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Instituto de Patobiología  
CICVyA, INTA Castelar

**“Estudio y evaluación de la dinámica de resistencia a  
cefalosporinas y fluoroquinolonas en *Salmonella spp.* y  
*Escherichia coli* en animales de producción”**

Tesis para optar por el al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Lic. Johana Elizabeth Dominguez

**Directora:** Mag M. Mol. Bioq. Elsa C. Mercado

**Co-Director:** Dr. José Di Conza

2016

*A mi familia y mi novio  
con todo mi amor*

## Agradecimientos

*Tengo tantas cosas y a tantas personas que agradecer que no me quiero olvidar de nadie.*

*Primero que nada quiero agradecer a Elsa, por darme oportunidad de llevar adelante esta tesis y de trabajar en Inta. Una experiencia que quería vivir desde que me recibí como licenciada.*

*A José, por su ayuda, consejos y por todo lo que me enseñó. Por la interminable lista de tareas, pero que gracias a eso pude cumplir con todos los objetivos previstos. Gracias por la paciencia que me tuviste y por todos los momentos compartidos.*

*A Mariano y Gabriel, por su apoyo y por permitirme trabajar libremente en el laboratorio y por los consejos recibidos, fue muy importante poder contar con ustedes.*

*A Pablo, por sus consejos, sus palabras de aliento y por su apoyo incondicional. Por los momentos compartidos en el laboratorio cada vez que teníamos tiempo, alguna cosa hacíamos juntos.*

*A Gio, por su gran apoyo, por todo lo que me enseñaste, por el afecto que siempre me diste desde que llegue al laboratorio y por las palabras de aliento cuando sentía que no podía. Por los momentos compartidos en el cepario y en Colombia. Por estar siempre a pesar de la distancia.*

*A Dani, Leo, Alan y Roque mis compañeros de experiencias, gracias por toda su ayuda y por todos los momentos compartidos que fueron muchas horas de trabajo pero que al lado de ustedes no parecieron tantas.*

*A mis compañeros de laboratorio y del sucucho: Dani, Nati, Juan, Marianito, Gabi y Charle. Por bancarme mis locuras y por las charlas y los miles de mates compartidos.*

*A las chicas del fondo: Barby G, Sabri, Mariam, Lu, Sol, Barbi A, Gabi, Meli, Vero, Vivi, Vale y Silvi, por ser las más divertidas, compañeras y que siempre me hicieron sentir muy bien. Gracias por la ayuda que cada una de ustedes me dio y por contar con su apoyo siempre. A Marce, Marta, Laura, Pablo, Magui y Mary, por compartir gratos momentos también con ustedes en el cepario.*

*A Loreley, por siempre estar presente, por ayudarme con todo lo que necesitaba preparar para cada experiencia y sobretodo y lo más importante, por tratarme con tanto cariño.*

*A mi amiga Cary, quien me ayudo a decidir dejar Mendoza y venir a hacer el doctorado. Por las interminables charlas a pesar de la distancia y su apoyo incondicional. Por todo su cariño.*

*Eli y Magali, mis compañeras y amigas de la facultad, por los momentos compartidos y principalmente por su amistad. A Yali, por ser una persona muy importante que conocí en esta etapa, amiga, consejera y compañera. Gracias por todo.*

*A Luisina, por ser mi amiga y compañera en esta experiencia que fue el doctorado, por compartir todas los momentos buenos y malos que tuvimos desde que llegamos a Inta. Por todo su aguante, por prestarme el oído cada vez me lo necesitaba, por los consejos y por enseñarme como ser cada día más fuerte.*

*A Dani, Vivi, Fernando, Martin, Magali y Fedra, quienes ya son parte de mi vida, por acompañarme en esta etapa, por su apoyo y palabras de aliento, por todos los momentos compartidos.*

*A mi mama Ruth, mi papa Luis y mi hermanita Mayra, por estar siempre pendiente de mí, por su amor, estímulo, confianza y compañía a pesar de la distancia. Por ofrecerme la oportunidad de seguir siempre mis sueños. Simplemente los amo.*

*Y a mi amor, Matías, por ser tan dulce y compañero, sin vos esto no hubiese sido posible. Por acompañarme en los buenos y no tan buenos momentos que transcurrimos juntos en esta etapa. Por tus palabras, que me ayudaron más de una vez a no decaer y a seguir adelante. Y gracias a este doctorado, te conocí y fue lo mejor que me paso en mi vida. Gracias por ser como sos. Te amo.*

*Gracias por todo!!!!*

## Índice

Agradecimientos .....	3
Abreviaturas .....	9
Resumen .....	11
Introducción .....	14
Resistencia antimicrobiana (RAM) .....	15
¿Por qué surge la resistencia dentro de un microorganismo? .....	15
¿Cómo se produce la transmisión de resistencia entre los microorganismos? .....	16
¿Por qué la resistencia emerge en la población a nivel humano? .....	18
¿Cuál es el papel de los animales y el medio ambiente en conducir la transmisión de la resistencia? .....	19
Los animales como reservorio de bacterias resistentes .....	22
Los antimicrobianos y la medicina veterinaria .....	23
Bases bioquímicas de la resistencia en bacterias gram negativas .....	30
β-lactámicos .....	30
Resistencia a β-lactámicos.....	33
Resistencia mediada por enzimas modificadoras e inactivadoras .....	34
β-lactamasas, también presentes en animales.....	40
Quinolonas .....	41
Estructura química y clasificación de las quinolonas .....	41
Mecanismos de acción de las quinolonas.....	43
Resistencia a quinolonas .....	44
Mecanismos Cromosómicos: mutaciones asociadas a las topoisomerasas diana de las quinolonas y fluoroquinolonas.....	44
Mecanismos plasmídicos.....	46
Resistencia a Colistina .....	50
Transferencia horizontal de genes .....	51
Sistemas toxina/antitoxina (TA) .....	54
Objetivo General .....	57
Objetivos Específicos.....	57
Materiales y Métodos .....	58
Determinación de la sensibilidad a Antimicrobianos .....	59
Ensayo de Difusión en medio sólido.....	59
Ensayo de Dilución en Medio Líquido: Determinación CIM.....	60

Determinación de co-resistencia.....	60
Detección fenotípica de $\beta$ -lactamasas.....	60
Ensayo Fenotípico de Detección de AmpC .....	60
Ensayo Fenotípico de Detección de BLEE .....	61
Ensayo fenotípico de Detección de Sensibilidad a Fluoroquinolonas.....	62
Método de difusión con discos.....	62
Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas .....	62
Extracción de ADN total por el método de lisis .....	63
Extracción de ADN total mediante Kit de extracción.....	63
Extracción de ADN plasmídico.....	63
Detección de mecanismos de resistencia por amplificación génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	64
Electroforesis en geles de agarosa .....	70
Secuenciación automatizada de ADN.....	70
Determinación de Grupos filogenéticos.....	71
Tipificación molecular de los aislamientos productores de pAmpC y <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> por técnicas basadas en PCR: REP-PCR y ERIC-PCR.....	72
Determinación de la localización plasmídica de $\beta$ -lactamasas tipo pAmpC y BLEE: ensayos de transferencia de genes.....	73
Conjugación en medio sólido .....	74
Conjugación en medio Líquido .....	74
Transformación por Electroporación.....	74
Análisis de los transformantes obtenidos .....	75
Determinación del tamaño molecular de los plásmidos portadores de determinantes de resistencia .....	75
Procedimiento de PFGE para <i>Salmonella</i> spp.....	76
Tipificación molecular de plásmidos.....	80
Multilocus sequence Typing (MLST).....	82
MLST de <i>Salmonella enterica</i> .....	82
Caracterización del entorno genético de la $\beta$ -lactamasa tipo pAmpC.....	83
Mapeo por PCR del entorno genético de <i>bla</i> <sub>CMY</sub> .....	83
Factores de virulencia en <i>E. coli</i> .....	84
Caracterización sistemas Toxina-Antitoxina .....	85
Caracterización de <i>mcr-1</i> en aislamientos de <i>E.coli</i> .....	85

Capítulo I: .....	87
Consideraciones generales sobre <i>Salmonella enterica</i> .....	87
Género <i>Salmonella</i> .....	88
Procedencia de los aislamientos .....	94
Aislamientos bacterianos I: <i>Salmonellas</i> spp. recuperadas de bovinos y equinos.....	94
Aislamientos bacterianos II: <i>Salmonella</i> spp. recuperadas de aves.....	94
Resultados.....	95
Aislamientos bacterianos I .....	96
Sensibilidad antibiótica .....	96
Análisis de $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G) .....	98
Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas .....	99
Evaluación de la transmisibilidad de los genes implicados en la resistencia a C3G .....	99
Caracterización molecular del plásmido portador de <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> .....	100
Entorno genético de <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> .....	101
Secuenciación del Plásmido pST10-16.....	102
Determinación de mutaciones presentes en QRDR y caracterización de los determinantes PMQR .....	107
Aislamientos bacterianos II .....	108
Sensibilidad antibiótica .....	108
Análisis de $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G) .....	113
Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas .....	116
Detección de genes PMQR .....	119
Determinación del fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a FQ.....	120
Caracterización epidemiológica de los aislamientos de <i>Salmonella</i> spp. recuperadas de aves mediante PFGE .....	123
Evaluación de la transmisibilidad de los genes implicados en la resistencia .....	129
Estimación del tamaño y el grupo de incompatibilidad de los plásmidos transferidos ...	131
Detección de genes codificantes del sistema toxina-antitoxina .....	133
Discusión .....	135
Capítulo II: .....	147
Consideraciones generales <i>E. coli</i> .....	147
Procedencia de los aislamientos .....	151

Aislamientos bacterianos III: <i>E. coli</i> recuperadas de bovinos .....	151
Aislamientos bacterianos IV: <i>E. coli</i> recuperadas de aves .....	151
Resultados.....	152
Aislamientos bacterianos III .....	153
Factores de virulencia .....	154
Sensibilidad antibiótica .....	157
Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas .....	158
Determinación de las mutaciones presentes en la región QRDR en <i>E. coli</i> .....	158
Detección de genes PMQR .....	160
Aislamientos bacterianos IV .....	161
Sensibilidad antibiótica .....	161
Análisis de mecanismos de $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G) .....	164
Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas .....	165
Determinación de los grupos filogenéticos .....	167
Tipificación molecular de los microorganismos productores de AmpC y <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> por técnicas basadas en PCR.....	169
Detección de genes PMQR .....	173
Determinación del fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a FQ.....	174
Mcr-1 en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> en aves.....	177
Discusión .....	185
Conclusiones .....	197
<i>Salmonella</i> spp. ....	198
<i>Escherichia coli</i> .....	200
Anexo .....	202
Tablas .....	203
Protocolos experimentales.....	214
Bibliografía .....	220

## Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AIC: Antibióticos de Importancia Crítica

API: Abejas

ARN: Ácido Ribonucleico

ATM: Antimicrobiano

AV: Aves

AVI: Antimicrobianos de Importancia

AVIC: Antimicrobianos Veterinarios de Importancia Crítica

AVMI: Antimicrobianos Veterinarios de Importancia Elevada

BLEA:  $\beta$ -lactamasas de Espectro Ampliado

BLEE:  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido

BOR: Ácido fenil borónico

BOV: Bovinos

C3G: Cefalosporinas de Tercera Generación

C4G: Cefalosporinas de Cuarta Generación

CAM: Camélidos

CAP: Caprinos

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CLA: Ácido Clavulánico

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CPM: Concentración Preventiva de Mutantes

EGM: Elementos genéticos móviles

EQU: Équidos

FQ: Fluoroquinolonas

HGT: Horizontal Gene Transfer

IS: Secuencia de Inserción

Kb: Kilobases

LEP: Conejos

MARS: Multiple Antibiotic Resistance

OIE: Organización mundial de sanidad animal

OMS: Organización Mundial de la Salud

OVI: Ovinos

PBPs: Penicillin Binding Proteins

PBRT: PCR-Based Replicon Typing Method

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PIS: Peces

pMLST: plasmid Multi-Locus Sequence Typing

PMQR: Plasmid Mediated Quinolone Resistance

QEP: Quinolone Efflux Pump

qnr: quinolone resistance

QRDR: quinolone resistance determinant

RAM: Resistencia a Antimicrobianos

ROS: Reactive Oxygen Species

SNT: *Salmonella* No Tifoidea

SST4: Sistema de Secreción Tipo 4

SUI: Suidos

## Resumen

El alarmante incremento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos (ATM) es sin duda, uno de los mayores problemas actuales de la salud pública. Estos compuestos constituyen una de las principales herramientas para controlar y prevenir infecciones bacterianas, tanto en medicina humana como veterinaria. La resistencia está directamente relacionada con el uso intensivo, muchas veces de forma indiscriminada, de los ATM. Las cefalosporinas de tercera generación (C3G), fluoroquinolonas (FQ) y colistina son ATM de importancia crítica en la medicina humana y se emplean en la medicina veterinaria con elevada frecuencia.

El objetivo de trabajo fue evaluar los mecanismos de resistencia a C3G, FQ, colistina y otros ATM en aislamientos de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* recuperados de establecimientos de producción avícola, de bovinos y equinos. Los aislamientos pertenecen a la colección del área de Bacteriología del Instituto de Patobiología, incluyendo a *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) de origen bovino, obtenidos entre los años 1998-2012. El resto de los aislamientos fueron recuperados de muestras de granjas avícolas de Buenos Aires y Entre Ríos durante los años 2010-2012 y 2014.

Los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados de bovinos y equinos, mostraron altos niveles de sensibilidad a C3G, FQ, carbapenemes y colistina. Las dos poblaciones analizadas, mostraron bajos niveles de sensibilidad a TET y SXT. Se describió por primera vez la detección de la  $\beta$ -lactamasa de tipo AmpC, CMY-2 de un único aislamiento con resistencia a C3G recuperado de equino. Se caracterizó la plataforma y el entorno genético de *bla*<sub>CMY-2</sub>. Posteriormente, se secuenció el plásmido completo de pST10-16. Se determinó el secuenciotipo presente en PST10-16, pero éste no ha sido definido en el esquema de pMLST.

En los aislamientos recuperados de pollos parrilleros y gallina ponedoras, *S. Heidelberg* fue la serovariedad prevalente dentro de los aislamientos (55%) provenientes de diferentes granjas de Buenos Aires y Entre Ríos. Aproximadamente el 50% de los aislamientos presentaron sensibilidad a C3G, un menor porcentaje a FQ y el total de los aislamientos sensibles a carbapenemes y

colistina. El mecanismo prevalente de resistencia a C3G observado en *Salmonella* spp. fue la producción de CMY-2, aunque se observó una menor proporción de BLEE provenientes del grupo CTX-M-14 y CTX-M2. El determinante PMQR prevalente en estos aislamientos fue *qnrB* (89,5%) y la variante alélica fue *qnrB5*, la cual no ha sido descrita previamente en aislamientos clínicos o veterinarios en nuestro país. Se describió en el 75% de los aislamientos de *S. Heidelberg* el mismo patrón de XbaI-PFGE, que demostró la propagación de un clon predominante entre las granjas.

En los aislamientos de *E. coli* STEC no-O157 recuperados de bovinos, el serotipo prevalente fue O26 y O111, donde el 87% de los aislamientos portadores de *stx1* contienen intimina, importante para la patogénesis de éstos aislamientos. Se observó un alto nivel de sensibilidad a las C3G ensayadas y solo dos aislamientos fueron productores de la cefalosporinasa CMY-2. De la misma manera presentaron un elevado porcentaje de sensibilidad a quinolonas y no mostraron resistencia a carbapenemes y colistina. Dentro de los genes PMQR detectados, *qnrA* fue el determinante prevalente.

Al contrario, en los aislamientos de *E. coli* recuperados de pollos parrilleros se observó un elevado nivel de resistencia a C3G, FQ y colistina. La proporción de resistencia a otras familias de ATM fue elevada destacándose la descripción de un gran número de aislamientos con multirresistencia (MDR). El mecanismo de resistencia prevalente a C3G, fue la cefotaximasa CTX-M-2, presentándose en combinación con CTX-M-14 y CMY-2. El análisis de la clonalidad de los aislamientos resistentes a C3G reveló una distribución heterogénea de los grupos filogenéticos encontrados. Los marcadores PMQR prevalentes fueron *qnrB* y *qnrS*, siendo las variantes alélicas identificadas como *qnrB5* y *qnrA1*, y se observó gran diversidad de otros determinantes PMQR. Se describió por primera vez en nuestro país, un elevado porcentaje de aislamientos con resistencia a colistina (COL) provenientes de animales y se detectó el gen *mcr-1*, mecanismo de resistencia de codificación plasmídica.

En este trabajo, no se observó co-transferencia de mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, pero si se detectó la transferencia del determinante *qnrB5* en los

aislamientos portadores, sugiriendo que comparte una localización en el mismo plásmido junto a *mcr-1*. Se identificó el plásmido IncK en las cepas salvajes y transconjugantes obtenidos, como el posible replicón que caracteriza el plásmido conjugativo portador del determinante de resistencia *mcr-1*.

Debemos considerar la sensibilidad a los ATM como un recurso limitado y no renovable, de muy lenta recuperación cuando se ha perdido y debemos ser capaces de implementar un sistema de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en las poblaciones animales y humana, ya que teniendo un mejor conocimiento de la ecología de bacterias resistentes y de los genes implicados en la resistencia, se podrá generar una mayor conciencia en las partes interesadas, sobre el uso prudente y responsable de los antimicrobianos en la población animal, en el ámbito clínico y sus consecuencias en el ambiente. Este problema, de origen multifactorial y de alcance global, trasciende fronteras, y requiere acciones inmediatas, integradas y multisectoriales. Los organismos internacionales dedicados a la salud (Organización Mundial de la Salud-OMS y la Organización de Sanidad Animal-OIE) han instado recientemente a los países a elaborar planes y a adoptar medidas para enfrentarlo, bajo el concepto de “Una salud”, con una visión integral de la sanidad animal y la salud pública a escala mundial.

# Introducción

## **Resistencia antimicrobiana (RAM)**

El alarmante incremento de la RAM es, sin duda, uno de los mayores problemas de la Salud Pública, y una amenaza para el sistema de salud, ya que estos compuestos constituyen una de las principales herramientas para controlar y tratar las infecciones bacterianas, tanto en medicina humana como en veterinaria.

Las bacterias patógenas y el hombre han mantenido una lucha constante a lo largo de la historia. Cuando en la primera mitad del siglo XX se desarrollaron los primeros antimicrobianos y se aplicaron a la clínica, el hombre creía haber ganado la batalla frente a los patógenos bacterianos. Sin embargo, al poco tiempo las bacterias demostraron una vez más el poder de su éxito evolutivo: su enorme plasticidad para adaptarse a nuevas presiones selectivas.

La resistencia a los antibióticos, es la capacidad que tiene los microorganismos de resistir al efecto de dichos fármacos, es decir que los microorganismos no mueren, y su crecimiento no se detiene. Las bacterias encuentran inevitablemente maneras de resistir a los antibióticos creados para destruirlos, haciéndolos ineficaces; por lo que es necesario evitar el desarrollo de una nueva forma de resistencia a través de cambios genéticos e impedir que la que resistencia que ya existe se propague.

El uso de antibióticos es el factor más importante que lleva a la resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Es decir el simple uso de antibióticos crea resistencia.

### **¿Por qué surge la resistencia dentro de un microorganismo?**

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los ejemplos mejor conocidos de adaptación rápida de las bacterias a un ecosistema que contenga estas moléculas. Los microorganismos a través de un proceso de selección darwiniana han desarrollado robustos mecanismos para evadir la destrucción de muchas sustancias tóxicas del ambiente.

La mayoría de los drogas antimicrobianas son naturalmente producidas por microorganismos (1) como un mecanismo de defensa frente a otros, o son

compuestos naturales modificados mediante síntesis química para dar lugar a compuestos análogos, denominados antimicrobianos, con notables mejoras en su actividad y reducción en su toxicidad.

La resistencia antimicrobiana es una amenaza debido a que el uso de antimicrobianos ha aumentado tanto en las últimas décadas que los microorganismos están expuestos a mayores concentraciones de un número cada vez mayor de antimicrobianos, aumentando las posibilidades de desarrollar resistencia.

Aunque no se sabe el origen, muchos microorganismos poseen genes-R (**determinantes de resistencia**) como forma de protección frente al efecto de las sustancias que ellos mismos elaboran; o mediante **mutaciones puntuales** que han permitido variaciones en genes esenciales, defendiendo a sus productos del ataque de determinados agentes. Los genes-R pueden mantenerse en las bacterias originarias y su descendencia (transmisión vertical), o bien diseminarse de forma horizontal, entre bacterias más o menos relacionadas. Por lo tanto, la emergencia de la resistencia antimicrobiana es una respuesta natural de evolución a la exposición a los antimicrobianos que los microorganismos explotan para sobrevivir a las presiones ejercidas por el ambiente.

### ¿Cómo se produce la transmisión de resistencia entre los microorganismos?

El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos puede ocurrir naturalmente (**resistencia intrínseca**), basada en las mutaciones de genes codificados sobre el cromosoma bacteriano, que ocurre de forma espontáneo en ausencia de presión de selección antimicrobiana (2).

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antimicrobianos (**resistencia adquirida**) cuando nuevo material genético es intercambiado entre los organismos. Esto se produce cuando al menos una bacteria dentro de un grupo heterogénea de bacterias lleva el determinante de resistencia capaz de expresar resistencia al antibiótico. Independientemente de la manera en que un gen es transferido a una bacteria, el desarrollo de la resistencia resulta en la expresión de

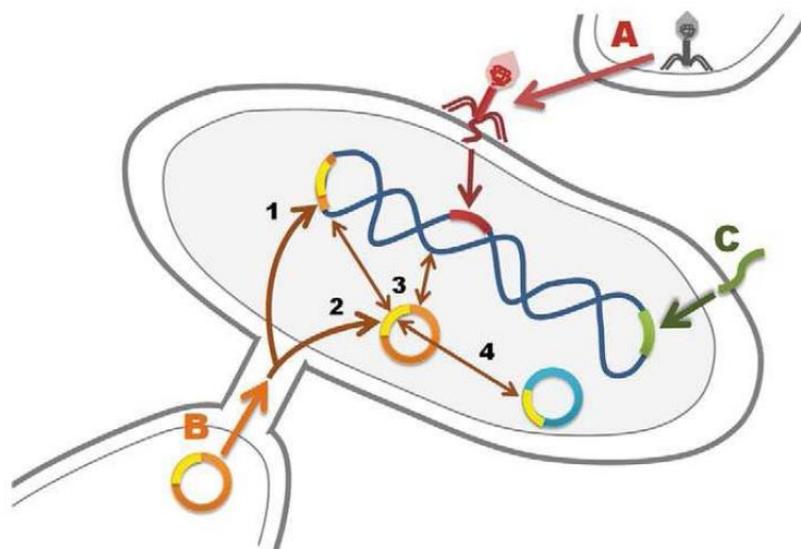
dicho gen, el cual puede ser transferido a otra bacteria permitiéndoles que se produzca un efecto biológico tangible, el cual inhibe la actividad del antibiótico. Ambos tipos de resistencia espontanea o adquirida, se puede transmitir horizontalmente o verticalmente.

La transmisión horizontal de la resistencia puede ocurrir a través de varios mecanismos (Figura 1), es decir el material genético puede ser transferido entre los microorganismos a través de tres rutas principales:

(i) **transformación:** algunas bacterias son capaces de captar ADN libre desde el ambiente e incorporarlo a su cromosoma;

(ii) **transducción:** donde virus que infectan bacterias (bacteriófagos) median la transferencia de ADN entre bacterias vía la transducción, en el cual ADN de una bacteria donante es empaquetado en la partícula del virus y es transferido a una bacteria receptora, durante la infección;

(iii) **conjugación:** es el mecanismo de transferencia de genes responsable de los aspectos más preocupantes de la resistencia antimicrobiana. Se forma un *pilus* sexual (pequeño tubo) entre dos células bacterianas a través del cual se transfiere ADN plasmídico.



**Figura 1:** Mecanismos de transmisión genética entre bacterias. **A- Transducción:** inserción de ADN mediante un bacteriófago. **B- Conjugación:** el plásmido de la bacteria

dadora se transfiere a la receptora mediante la formación de un pilus. **1-** El plásmido se puede insertar en el cromosoma bacteriano. **2-** El plásmido puede quedar libre en el citoplasma bacteriano. **3-** Distintos estados del ADN plasmídico, libre o integrado al cromosoma bacteriano. **4-** El plásmido puede intercambiar material genético como secuencias de inserción o transposones con otros plásmidos o con el cromosoma. **C-Transformación:** adquisición de ADN libre desde el medio. Figura adaptada de Gyles y col (3).

### ¿Por qué la resistencia emerge en la población a nivel humano?

Es ahora bien entendido a nivel molecular, que un mismo gen de resistencia puede ser identificado en especies patógenas para humanos, así como también en bacterias las cuales crecen en el contexto agrario, en la carne de animales de consumo y en animales de compañía, lo que sugiere que la RAM crece y es independiente del contexto. Sin embargo, la aparición de la resistencia puede ser acelerada debido al uso frecuente y generalizado de los antimicrobianos.

Diversos estudios han demostrado que la RAM, surgió en parte como resultado de la presión selectiva ejercida por utilizar antimicrobianos fuera de la medicina humana; es decir en medicina veterinaria, en la alimentación animal, en la producción de peces y en la agricultura. Se utiliza una mayor cantidad de antimicrobianos en la producción de alimentos comparada con la utilización en los seres humanos, mostrando marcadas diferencias en la producción de alimentos de origen animal.

Este uso, mal uso o uso excesivo de medicamentos, se considera que es un importante factor que influye en el desarrollo de la resistencia. Por lo tanto, presiones selectivas ejercidas por la, exposición a antimicrobianos permiten que microorganismos con determinada resistencia, sobrevivan e incluso proliferen. Aislamientos de *Escherichia coli* no patógenos resistentes, han sido implicados en la transmisión de determinantes de resistencia y estos determinantes pueden llegar a la microbiota intestinal por el consumo de leche o carne contaminada (4). El conocimiento de cómo se produce la colonización del intestino humano es aún incompleto, pero es sabido que la flora endógena de origen animal puede

propagarse a través de la cadena alimentaria y colonizar transitoriamente el intestino humano. Esto se traduce inicialmente en un estado de portador silencioso, que más tarde puede dar lugar a infecciones aparentemente no relacionadas y una mayor gravedad de la enfermedad, dando lugar a peores resultados en los pacientes debido a la falla en la terapia con antimicrobianos.

Sin embargo, aunque la relación entre el uso humano de antimicrobianos y aparición de la resistencia parece clara, esta asociación es compleja. Hay que tener en cuenta diversos factores: interacciones patógeno-antimicrobiano y patógeno-hospedador; las tasas de mutación del patógeno; la aparición con éxito de clones resistentes a los antimicrobianos; la tasa de transmisión del patógeno entre humanos, animales y el ambiente; además del fenómeno de resistencia cruzada y la selección de co-resistencia a antimicrobianos no relacionados.

Por lo tanto, el papel del uso de antimicrobianos en la aparición de la resistencia es complicado y esto significa que hay que ser conscientes de la complejidad del tema en cuestión y que se debe adoptar un enfoque integrado tanto en la comunidad, en la agricultura y el medio ambiente, para tratar de minimizar los efectos de la resistencia en la salud pública en general.

### **¿Cuál es el papel de los animales y el medio ambiente en conducir la transmisión de la resistencia?**

Según datos de la OMS, la mitad de la producción mundial de antibióticos se destina al uso veterinario, los antimicrobianos se emplean con fines terapéuticos, profiláctico, metafiláctico y como promotores de crecimiento. Las dos primeras aplicaciones tienen el mismo uso que en la medicina humana, y se aplican para tratar y/o prevenir infecciones producidas por bacterias. Sin embargo, existe también la utilización específica de antimicrobianos en animales de producción, denominado metafilaxia, en donde el antibiótico es administrado a un lote de animales que se conoce que han tenido contacto con el agente infeccioso y así evitar un brote.

Por último los antimicrobianos pueden ser utilizados como promotores de crecimiento, mediante su administración en dosis sub-terapéuticas con el objetivo de beneficiar la ganancia de peso y aumentar de esta manera la eficacia productiva. Asimismo, también son utilizados con el fin de controlar bacterias zoonóticas.

La utilización de antibióticos como promotores de crecimiento se hace en cantidades muy inferiores a las utilizadas en la profilaxis o tratamiento. El antibiótico se mezcla con el agua o el pienso del animal y consigue debilitar el efecto barrera ejercido por la flora intestinal, dando lugar a una mayor absorción de nutrientes y aumentando el ritmo de crecimiento. En esta situación el uso de antibióticos se hace más necesario ya que los animales están más expuestos a las infecciones al no ser capaces de desarrollar, en tan poco tiempo, un sistema inmunitario eficaz.

Esta aplicación de los antimicrobianos se remonta a principios de la década de los 50, cuando se descubrió que pequeñas dosis de tetraciclina mejoraban el crecimiento del ganado (5). A finales de la década de los 60 surgieron las primeras voces de alerta sobre el incremento de la resistencia a cloranfenicol en *Salmonella* spp. y la posible implicación del consumo en antibióticos como promotores de crecimiento en la aparición de aislamientos clínicos resistentes.

Desde la aparición de las primeras resistencias cruzadas entre cepas de origen animal y humano, y especialmente desde la sugerencia de que el uso de avoparcina como aditivo alimentario en el pienso fue la causa del incremento de la resistencia a la vancomicina en enterococos aislados de muestras clínicas, se ha propuesto la total eliminación de antibióticos como promotores de crecimiento (6, 7) aunque la contribución directa del uso de antibióticos en animales a la resistencia de cepas clínicas es muy cuestionada (8, 9). A pesar de estas y otras pruebas, la prohibición europea sobre el uso de antimicrobianos para la promoción del crecimiento en el ganado no se realizó hasta el 2006, y fuera de la Unión Europea, el uso de promotores no se ha prohibido, incluyendo Latinoamérica.

El alarma social creada por el uso de antimicrobianos en animales de producción y la aparición de bacterias resistentes en muestras de origen humano ha provocado

distintas reacciones. Algunos países han comunicado su rechazo, suspendiendo la importación de alimentos de origen animal donde se utilicen antimicrobianos durante la producción; lo que gran parte de los productores de alimentos, han respondido respetando estrictamente el período de retiro del antimicrobiano antes que el producto salga a la venta o directamente suspendiendo el uso; por ejemplo suspendieron el empleo de quinolonas para el tratamiento de animales (10) debido a su utilización también en la medicina humana.

Es importante señalar que la resistencia de ciertos antibióticos es crítica; uno de los antibióticos que está causa mayor preocupación, son el grupo de las fluoroquinolonas tan usado en veterinaria. Países como Japón sólo permiten el uso de quinolonas en animales, cuando éste sea el único tratamiento de elección, siempre bajo la supervisión de un veterinario y durante un tiempo máximo de cinco días (11). El alerta creada ante el gran aumento de cepas con sensibilidad disminuida a quinolonas a mediados de los 90's, empujó a la OMS a convocar a una reunión especial sobre el impacto en salud humana del uso de quinolonas en animales (OMS, 1998).

La contribución del medio ambiente a la resistencia antimicrobiana es también preocupante. El uso de metales en la agricultura (por ejemplo, cuando se aplica directamente cobre como agente bactericida y fungicida); dado que muchos metales co-seleccionan determinados genes de resistencia. Incluso el uso general de fertilizantes nitrogenados podría afectar el contenido del suelo en genes de resistencia a antibióticos, causando un desbalance en cuanto a la relación y la abundancia de microorganismos.

Actualmente, existe una necesidad de comprender los factores ambientales que puede contribuir al desarrollo de patógenos resistentes e identificar cualquier interacción modificable para reducir o prevenir una mayor propagación de la resistencia al entorno, tal cual fue expresado en el informe mundial de la OMS 2014 ([http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/development\\_process/es/](http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/development_process/es/)).

## Los animales como reservorio de bacterias resistentes

En la actualidad, se presta especial atención a la eficacia de los llamados “antibióticos de importancia crítica” (AIC) como:

- **cefalosporinas de tercera generación (C3G)**
- **cefalosporinas de cuarta generación (C4G)**
- **fluoroquinolonas (FQ)**

Siendo los antimicrobianos de importancia en la medicina humana, y actualmente se emplean en veterinaria con elevada frecuencia.

Los animales productores de alimentos son considerados el principal reservorio de *Salmonella* no Typhi, *E. coli* y *Campylobacter* causantes de las infecciones entéricas en humanos. Estos patógenos zoonóticos pueden propagarse a través de la cadena alimentaria debido al manejo inadecuado o insuficiente cocción de los alimentos, causando diarrea autolimitada, que normalmente no requiere tratamiento médico. Pero en infecciones más severas, que cursan con complicaciones, como puede ser desde fiebre hasta sintomatología mucho más grave, las cefalosporinas de espectro extendido y fluoroquinolonas son los antibióticos de elección en el tratamiento de la salmonelosis, por lo que la presencia de resistencia se vuelve importante y puede conducir al fracaso del tratamiento (12).

En el contexto veterinario, la presencia de resistencia en *E. coli* y *Salmonella* spp. ha causado altos niveles de mortalidad y morbilidad en terneros e infecciones fatales en animales domésticos (13, 14).

Las cefalosporinas de espectro extendido de uso por prescripción veterinaria, están limitadas al tratamiento de enfermedades clínicas. Cefalonio, cefoperazona, cefquinoma, ceftiofur y cefuroxima, son las cefalosporinas frecuentemente usadas y son aprobadas exclusivamente para el tratamiento de enfermedades animales tales como metritis, mastitis en el ganado, las enfermedades respiratorias en rumiantes, caballos y cerdos; la enteritis necrótica y colisepticemia en aves de corral, y la septicemia causada por *E. coli* en terneros (15). Cefotaxima y cefalexina

son los antibióticos de elección para el tratamiento de cistitis y heridas de la piel, en gatos y perros.

Las fluoroquinolonas son un grupo de agentes antibacterianos sintéticos usados tanto en la medicina veterinaria como humana para el tratamiento de una variedad de enfermedades infecciosas. Entre las más conocidas y usadas en veterinaria incluyen ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina y sarafloxacina (16).

La enrofloxacina es una fluoroquinolona desarrollada en la década de los 80 para su uso exclusivo en veterinaria. Es eficaz en tratamientos profilácticos y terapéuticos de pollos con infecciones causadas por *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *H. paragallinarum*, *P. multocida* (17) y asociaciones entre *E. coli* y *Mycoplasma* spp. (18). Se demostró en terneros la eficacia de la enrofloxacina en diarreas y sepsis producidas por *E. coli*, en infecciones experimentales del tracto respiratorio con *P. haemolytica* y *M. bovis*, y en infecciones latentes o manifiestas producidas por *Salmonella* spp. (17). Se ha comprobado su eficiencia en diferentes producciones como cerdos, ovinos, y en pequeños animales como felinos y caninos; pero el amplio espectro de actividad antimicrobiana, y el excelente comportamiento farmacocinético, han hecho de las fluoroquinolonas agentes muy atractivos para el tratamiento de infecciones severas, tanto en el hombre como en los animales. Hay evidencias que indican la emergencia de bacterias resistentes en animales tratados con fluoroquinolonas (19).

### **Los antimicrobianos y la medicina veterinaria**

La resistencia a los agentes microbianos constituye una preocupación mundial para la salud pública y animal que está influenciada, como mencionamos anteriormente, por el uso de dichos agentes tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Por lo cual, los sectores encargados del cuidado de los humanos, animales y vegetales, comparten responsabilidades al prevenir o minimizar las presiones de selección de resistencia a los agentes antimicrobianos sobre las bacterias patógenas.

La OMS desarrolló el concepto de antimicrobianos de importancia crítica (AIC) para los seres humanos; mientras por su lado la OIE consignó de igual manera una lista de los criterios de identificación de estos agentes antimicrobianos de importancia crítica para los animales. La superposición de las listas críticas establecidas para la medicina humana y veterinaria puede proporcionar información y permitir que se alcance un equilibrio adecuado entre las necesidades zoonosológicas y las consideraciones en materia de Salud Pública.

Con el fin de proporcionar una lista completa, la OIE decidió tratar los agentes antimicrobianos usados en animales destinados a la producción de alimentos, dividiéndolos en:

- agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica (AVIC)
- agentes antimicrobianos de importancia elevada (AVMI)
- agentes antimicrobianos de importancia (AVI)

Se seleccionaron dos criterios para determinar el grado de importancia de las diferentes clases de agentes antimicrobianos veterinarios:

- *Criterio 1:* tasa de respuesta al cuestionario sobre los agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria.  
Se consideró que este criterio se cumplía cuando una mayoría de los que respondieron (más del 50%) señalaron la importancia de una determinada clase de agentes antimicrobianos.
- *Criterio 2:* tratamiento de una enfermedad grave de los animales y disponibilidad de agentes antimicrobianos alternativos.  
Se consideró que este criterio se cumplía cuando se identificaron los compuestos de una clase como esenciales contra determinadas infecciones y se carecía de alternativas terapéuticas suficientes.

Basándose en estos criterios, se establecieron las siguientes categorías:

- Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica: son aquellos que cumplen a la vez los criterios 1 y 2.

- Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia elevada: son aquellos que cumplen el criterio 1 o el 2.
- Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia: son aquellos que no cumplen ni el criterio 1 ni el 2.

Dentro de la categoría de agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica de la lista confeccionada por la OIE, algunas clases son de importancia crítica tanto para la salud humana como para la sanidad animal, como es actualmente el caso de las FQ, C3G y C4G. Por lo tanto, esas dos clases de agentes deberán emplearse de acuerdo con las siguientes consideraciones:

- No usarse como tratamiento preventivo aplicado en los alimentos o el agua en ausencia de signos clínicos en el/los animal/es tratado/s.
- No usarse como primer tratamiento a menos que esté justificado; cuando se emplee como segundo tratamiento, en teoría deberá realizarse sobre la base de los resultados de pruebas bacteriológicas.
- Su uso fuera de lo indicado en su autorización de comercialización o diferente del resumen de las características del producto deberá limitarse y reservarse a los casos en los que no existan otras opciones de sustitución.

El comité de la OIE aprobó una lista de agentes antimicrobianos de importancia para la medicina veterinaria (Mayo 2015).

#### **LISTA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS IMPORTANTES PARA LA MEDICINA VETERINARIA**

En las siguientes páginas aparece solo un extracto del listado original (ver Anexo, Tablas) de los antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria, sobre los que se centra este trabajo de tesis (Tabla 1).

Las especies animales en las que se usan los agentes antimicrobianos se abrevian de las siguientes formas:

**AVI:** aves; **API:** abejas; **BOV:** bovinos; **CAP:** caprinos; **CAM:** camélidos; **EQU:** équidos; **LEP:** conejos; **OVI:** ovinos; **PIS:** peces; **SUI:** suidos.

**AVIC:** agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica

**AVMI:** agentes antimicrobianos veterinarios de importancia elevada

**AVI:** agentes antimicrobianos veterinarios de importancia

**Tabla 1:** agentes antimicrobianos de importantes para la medicina veterinaria

Agentes Antimicrobianos (Clase, subclase, sustancia)	Especie	Observaciones específicas	AVIC	AVMI	AVI
<b>CEFALOSPORINAS</b>					
<b>CEFALOSPORINAS DE PRIMERA GENERACIÓN</b>					
Cefacetil	BOV	Las cefaloporinas se usan para el tratamiento de septicemias, de infecciones respiratorias y de las mastitis.		X	
Cefalexina	BOV, CAP, EQU, OVI, SUI				
Cefalotina	EQU,				
Cefapirina	BOV				
Cefazolina	BOV, CAP, OVI				
Cefaloium	BOV, CAP, OVI				
<b>CEFALOSPORINAS DE SEGUNDA GENERACIÓN</b>					
Cefuroxima	BOV				
<b>CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN</b>		La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a <b>las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.</b>	X		
Cefoperazona	BOV, CAP, OVI				
Ceftiofur	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Ceftriaxona	AVI, BOV, OVI, SUI	Se usan para el tratamiento de septicemias, de las infecciones respiratorias y de las mastitis.			
<b>CEFALOSPORINAS DE CUARTA GENERACIÓN</b>		Las alternativas tienen una eficacia limitada debido a un espectro inadecuado o a la presencia de resistencia a los agentes			
Cefquinoma	BOV, CAP, EQU, LEP, OVI,				

	SUI	antimicrobianos.			
<b>PENICILINAS</b>					
<b>PENICILINAS NATURALES (incluidas esteres y sales)</b>					
Benethamine penicilina	BOV				
Bencilpenicilina	AVI, BOV,CAM, CAP,EQU, LEP,OVI,SUI	<b>Actualmente, penetamato (iohidrato) solo se usa en animales.</b>			
Penetamato (iohidrato)	BOV	La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a las penicilinas en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.			
Bencilpenicilina procaína/ Penicilina Benzatina	BOV, CAM. CAP, EQU, OVI, SUI				
<b>AMDINOPENICILINAS</b>		Se las usa para el tratamiento de las septicemias, y de las infecciones respiratorias y de las vías urinarias.			
Mecilinam					
<b>AMINOPENICILINAS</b>					
Amoxicilina	AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, PIS, SUI				
Ampicilina	AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, PIS, SUI				
Hetacilina	BOV				
<b>AMINOPENICILINAS + INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS</b>		Esta clase es importante para el tratamiento en una amplia gama de especies animales.			
Amoxicilina+ Ácido clavulánico	AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, SUI	Se disponen de pocas alternativas económicas.			
Ampicilina+ Sulbactam	AVI, BOV, SUI				
<b>CARBOXIPENICILINAS</b>					
Ticarcilina	EQU				
Tobicilina	PIS				

X

<b>UREIDOPENICILINAS</b>				
Aspoxicilina	BOV, SUI			
<b>FENOXIPENICILINAS</b>				
Fenoximetilpenicilina	AVI, SUI			
Feneticilina	EQU			
<b>PENICILINAS ANTIESTAFOCOCOS</b>				
Cloxacilina	BOV, CAP, EQU, OVI, SUI			
Dicloxacilina	BOV, CAP,OVI, AVI, SUI			
Nafcilina	BOV, CAP,OVI			
Oxacilina	BOV, CAP,EQU, OVI, AVI,SUI			
Tiamulina	AVI, CEP, LEP, OVI, SUI			
Valnemulina	AVI, SUI			
<b>POLIPEPTIDOS</b>				
Enramicina	AVI, SUI			
Gramicidina	EQU			
Bacitracina	AVI, BOV, LEP, SUI, OVI	La bacitracina se usa contra la enteritis necótica en aves de corral.		
<b>POLIP. CÍCLICOS</b>		Esta clase está indicada para las septicemias, colibacilosis, salmonelosis e infecciones urinarias.		X
<b>Colistina</b>	AVI, BOV,CAP, EQU, LEP, OVI, SUI	Los polipéptidos cíclicos se usan para las infecciones digestivas de gram negativas.		
Polimixina	BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, AVI			
<b>QUINOLONAS</b>				
<b>QUINOLONAS PRIMERA</b>		Las quinolonas de primera generación se usan para el tratamiento de septicemias e		X

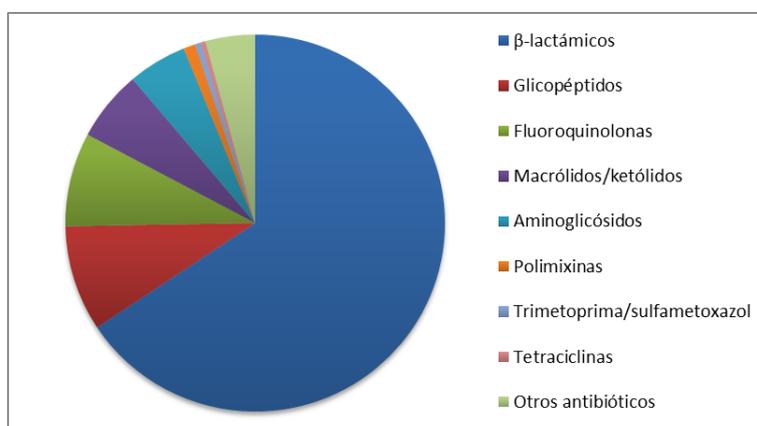
<b>GENERACION</b>		infecciones, tales como la colibacilosis.			
Flumequina	AVI, BOV,CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI				
Miloxacina	PIS				
Ácido nalidíxico	BOV				
Ácido oxolínico	AVI, BOV, LEP, PIS, SUI, OVI				
<b>QUINOLONAS PRIMERA GENERACION (FLUOROQUINOLONAS)</b>					
Ciprofloxacina	AVI, BOV, SUI				
Danofloxacina	AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI				
Difloxacina	AVI, BOV, LEP, SUI				
Enrofloxacina	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a las fluoroquinolonas en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.	<b>X</b>		
Marbofloxacina	AVI, BOV, EQU, LEP, SUI	Las fluoroquinolonas tienen una importancia crítica para el tratamiento de septicemias, e infecciones respiratorias y digestivas.			
Norfloxacina	AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI				
Ofloxacina	AVI, SUI				
Orbifloxacina	BOV, SUI				
Sarafloxacina	PIS				

## Bases bioquímicas de la resistencia en bacterias gram negativas

### $\beta$ -lactámicos

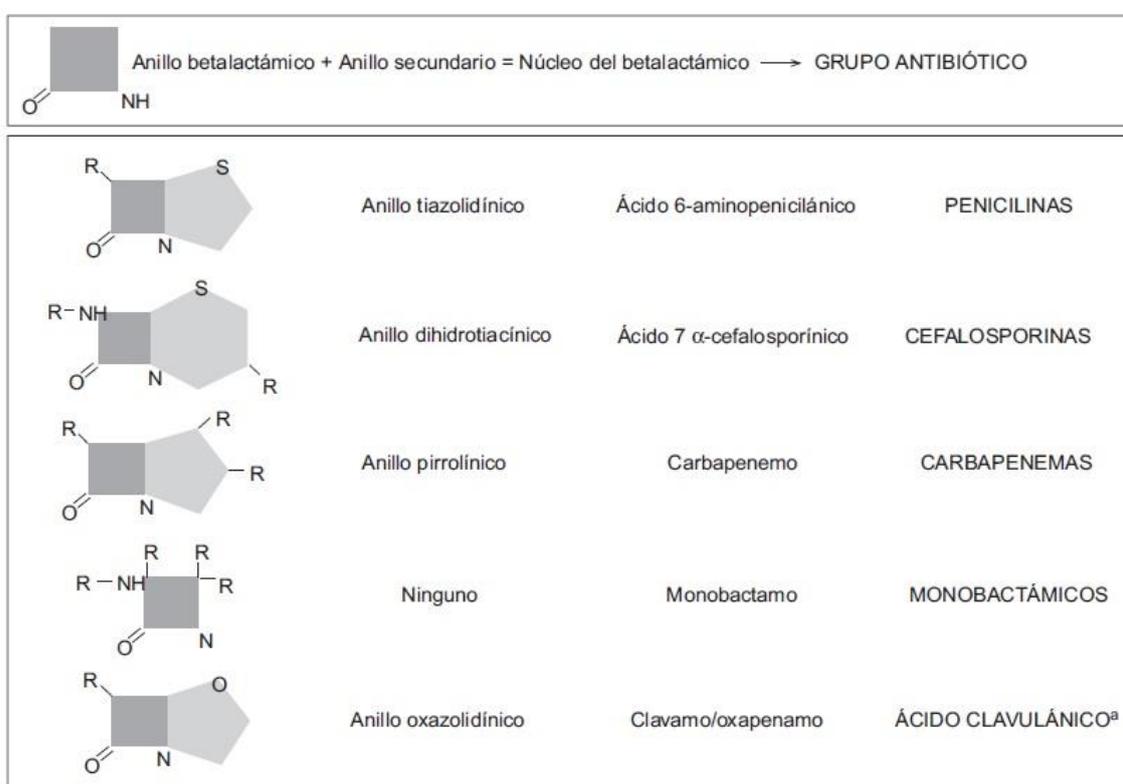
Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cuyo primer representante fue la penicilina descubierta por Fleming en 1929, constituyen uno de los grupos de antibióticos más prescritos, tanto en la clínica humana como veterinaria.

Los  $\beta$ -lactámicos son actualmente la clase de agentes antibacterianos más utilizados como arsenal para el tratamiento terapéutico de enfermedades infecciosas (20). Éstos representan el 65% del total de antibióticos inyectables prescritos en los EE. UU (Figura 2). Dentro de los  $\beta$ -lactámicos, las cefalosporinas comprenden cerca de la mitad de las prescripciones. Los  $\beta$ -lactámicos son usados universalmente como los antibióticos de elección para las infecciones clínicas causadas por *Enterobacteriaceae* y no solo en los humanos sino también en animales domésticos.



**Figura 2:** Proporción de prescripciones en los EE. UU de antibióticos inyectables de diferentes clases entre los años 2004-2014. El porcentaje de cada antibiótico inyectable es el mostrado a continuación:  $\beta$ -lactámicos (65,24%); glicopéptidos (9%); fluoroquinolonas (8%); macrólidos/ketólidos (6%); aminoglicósidos (5%); trimetoprima/sulametoxazol (0,5%); tetraciclinas (excluyendo tigeciclina, 0,4%); otros antibióticos (incluyendo daptomicina, linezolid y tigeciclina, 4,21%). Datos tomados desde: IMS MDART Quarterly Database on file at AstraZeneza.

Estos compuestos químicos deben su nombre a la presencia de un anillo de cuatro átomos, denominado anillo  $\beta$ -lactámico, que define químicamente a esta familia y que pueden tener acoplado un segundo anillo. Según la presencia o ausencia del segundo anillo y de sus características químicas, definen distintas clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Figura 3). Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar características del antibiótico como el espectro, la afinidad por determinados blancos moleculares o la resistencia a las  $\beta$ -lactamasas. Los  $\beta$ -lactámicos se caracterizan por presentar baja toxicidad, alta eficacia y son ampliamente prescritos.



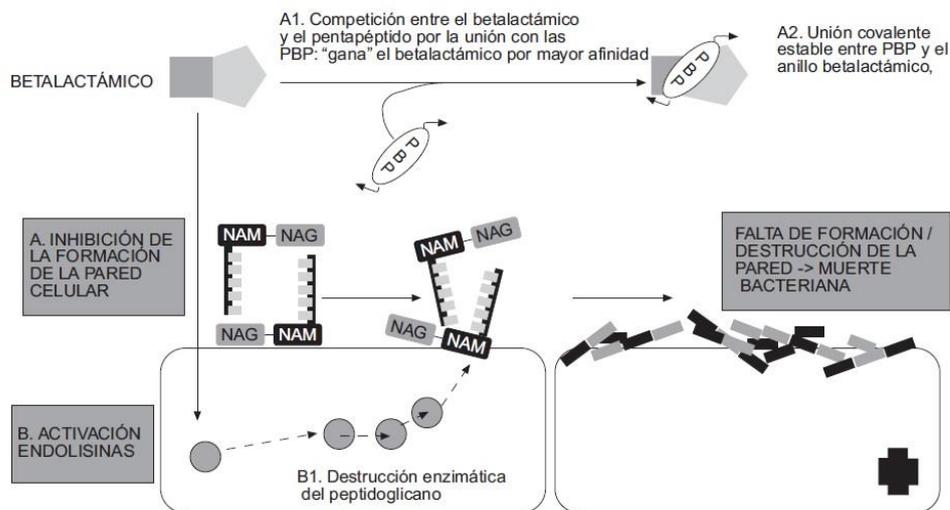
**Figura 3:** Moléculas básicas de las que derivan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos utilizados en la actualidad (21). <sup>a</sup> Todos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido Clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico. Figura tomada de *Súarez y col* (21).

Son agentes antibacterianos que interrumpen la formación de la pared celular bacteriana como resultado de la unión covalente a proteínas que participan de la

síntesis de peptidoglicano, denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (**PBPs- Penicillin Binding Proteins**), e inducen un efecto autocatalítico (22).

El peptidoglicano es una macromolécula que envuelve por completo a la célula bacteriana y constituye uno de los principales componentes de su pared, permitiéndole soportar la presión de turgencia que ejerce el citoplasma sobre la membrana plasmática. Se trata de una estructura de presencia bacteriana exclusivamente, lo que la transforma en un blanco celular de elección a la hora de diseñar antimicrobianos con toxicidad selectiva elevada.

Los  $\beta$ -lactámicos bloquean la fase final de síntesis del peptidoglicano, al inhibir la actividad de las PBPs, en la reacción de transpeptidación en la última etapa de síntesis de la pared celular; de modo que la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Cada especie bacteriana tiene su propio conjunto distintivo de PBP que pueden ir desde tres a ocho enzimas por especie. La inhibición de la transpeptidación del peptidoglicano bacteriano por la penicilina fue descrito por primera vez en 1965, donde se observó una similitud estructural de la penicilina G al dipéptido terminal D-Ala-D-Ala del peptidoglicano en la célula bacteriana en división. Este mecanismo ahora conocido, implica la unión de la penicilina (u otro  $\beta$ -lactámico), a una serina del sitio activo que se encuentra en todas las PBP funcionales. Esta unión resultante permite hidrolizar lentamente el antibiótico para formar una entidad microbiológicamente inactiva.



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

**Figura 4:** Mecanismo de acción de  $\beta$ -lactámicos. Adaptado de (21).

Dentro de la familia de  $\beta$ -lactámicos existen diferentes grupos: **penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactamas e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas**. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química modifican las características tales como el espectro de acción, afinidad y la resistencia a  $\beta$ -lactamasas. Ejemplo de ello, son las cefalosporinas, que pueden clasificarse en cuatro generaciones. Cada generación de cefalosporinas tiene mayor potencia frente a bacterias gram negativas, perdiendo actividad frente a bacterias Gram-positivas.

### Resistencia a $\beta$ -lactámicos

La resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos puede producirse por distintos mecanismos:

- ✓ Modificación de las dianas (proteínas PBP) o síntesis de moléculas alternativas.
- ✓ Modificación de la membrana bacteriana mediante la reducción de la permeabilidad al antimicrobiano.
- ✓ Expulsión activa del antibiótico fuera de la célula.
- ✓ Presencia de enzimas específicas que modifican o producen la inactivación enzimática del antibiótico antes o después de penetrar en la bacteria, por las denominadas  $\beta$ -lactamasas.

Estos mecanismos no tienen por qué darse de forma aislada, sino que dos o más pueden interactuar para determinar el nivel final de resistencia de un microorganismo.

A lo largo de la introducción nos centraremos en las enzimas  $\beta$ -lactamasas, por ser el mecanismo más importante de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en bacterias gram negativas, especialmente en las enterobacterias (23-25) y es el que se abordará con mayor profundidad en este trabajo de tesis.

## Resistencia mediada por enzimas modificadoras e inactivadoras

El mecanismo más importante de resistencia a  $\beta$ -lactámicos es la producción de enzimas específicas ( **$\beta$ -lactamasas**) que se unen al antibiótico hidrolizándolo. Son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros  $\beta$ -lactámicos, dando lugar a compuestos con actividad antimicrobiana. Se han descrito más de 1000 enzimas de este tipo (26), que han sido clasificadas utilizando dos aproximaciones:

- En función de la estructura proteica, propuesta por Ambler en 1980 (27), divide las  $\beta$ -lactamasas en clases A, B, C y D. Las enzimas de clase A, C, D son serin-betalactamasas, independientes de metales; mientras que las enzimas de clase B, son metalo-betalactamasas, dependientes de la presencia de  $Zn^{2+}$ .
- En función de sus características bioquímicas y funcionales, propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 y actualizada por Bush-Jacoby en el 2010 (26, 28). Esta clasificación establece distintos grupos, en función del sustrato y perfil de inhibición por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

En la Tabla 2, se resume la correlación entre los sistemas de clasificación.

**Tabla 2:** Sistemas de clasificación de  $\beta$ -lactamasas. Adaptado de Bush *y col.* (26)

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by	
				CA or TZB <sup>a</sup>	EDTA
1	1	C	Cephalosporins	No	No
1e	NI <sup>b</sup>	C	Cephalosporins	No	No
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No
2br	2br	A	Penicillins	No	No
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes
		B (B3)			
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes
NI	4	Unknown			

<sup>a</sup> CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

<sup>b</sup> NI, not included.

Debido al uso intensivo de los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro administrados oralmente como ampicilina, amoxicilina o cefalexina, se fue ejerciendo cierta presión de selección que permitió la selección de microorganismos Gram-negativos productores de  **$\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA)**, tales como TEM-1 ampliamente diseminada en *E. coli*, mientras que SHV-1 se encuentra con menos frecuencia y tiene su origen en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae*. La localización plasmídica de los genes codificantes de las BLEA ha favorecido su diseminación y su propagación, no solo en *E. coli* y *K. pneumoniae*, sino también a otros géneros bacterianos.

Este grupo de enzimas son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam; por lo que el tratamiento de microorganismos portadores puede realizarse en combinación con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas, como amoxicilina-ácido clavulánico; ampicilina-sulbactam o piperaciclina-tazobactam (23, 26).

La resistencia antimicrobiana a los  $\beta$ -lactámicos clásicos de amplio espectro condujo al desarrollo de cefalosporinas de segunda y tercera generación, oxiiimino-cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona) y se introdujo también el uso de monobactamas tales como aztreonam. Posteriormente, surgieron nuevas familias de  $\beta$ -lactamasas. Uno de los grupos de enzimas epidemiológicamente “exitosos” son  **$\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)**, cuyo perfil de hidrólisis comprende penicilinas, cefalosporinas de primera (C1G), segunda (C2G) y tercera generación (C3G), y monobactamas. En un inicio las BLEE se identificaron como variantes aminoacídicas de BLEA, originadas por mutaciones puntuales. Estas sustituciones aminoacídicas cambian el sitio activo de la  $\beta$ -lactamasa, se amplía su espectro de acción y consecuentemente resulta en la resistencia a cefalosporinas de espectro extendido. Los nuevos alelos de las familias de enzimas SHV y TEM, fueron denominados en orden cronológico (por ejemplo SHV-2, SHV-3, etc; TEM-2, TEM-3, respectivamente) pero no necesariamente esto coincide con su espectro antimicrobiano.

Sin embargo, comenzaron a describirse, microorganismos resistentes a cefotaxima, las enzimas CTX-M, las cuales actualmente representan las BLEE prevalentes a nivel mundial. Estas enzimas están codificadas en el cromosoma de *Kluyvera* spp., por lo que se las considera cefotaximasas naturales cuyos genes fueron reclutados por diferentes plataformas genéticas móviles que explicarían su amplia diseminación en plásmidos de multirresistencia (29). Éstas emergieron por una transferencia de genes BLEE pre-existentes en el cromosoma de organismos no patógenos, como *Kluyvera* spp. (30, 31).

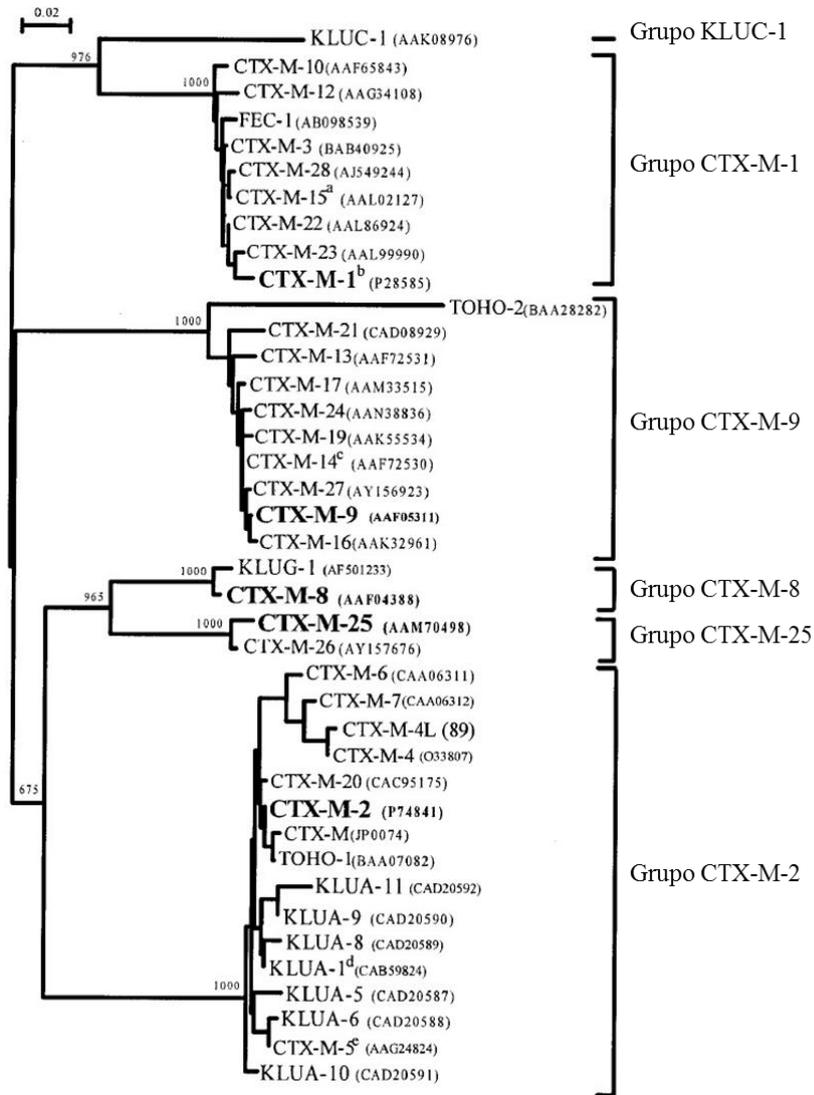
Las BLEE son serin- $\beta$ -lactamasas de clase A y son inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas tales como ácido clavulánico y tazobactam. Esta característica constituye la base para el diagnóstico fenotípico de bacterias productoras de BLEE de acuerdo a lo sugerido por las normativas del CLSI(32). Las BLEE pertenecen al grupo 2be, en base a la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros.

Las BLEE confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo las cefalosporinas de tercera (oxiimo-cefalosporinas; cefotaxima,

ceftriazona, ceftazidima) y cefalosporinas de cuarta generación (cefepime) y los monobactámicos como el aztreonam; aunque no afectan a las cefamicinas (cefexitina) ni a los carbapenémicos (imipenem, meropenem o doripenem) (26, 33). A pesar de que las enterobacterias productoras de BLEE pueden hidrolizar penicilinas, cefalosporinas (excluyendo cefamicinas) y monobactamas, su grado de actividad hidrolítica puede variar considerablemente.

Las primeras BLEE de tipo CTX-M fueron identificadas en la década de 90 aproximadamente al mismo tiempo en Europa y Argentina. Desde entonces, se han transformado en la familia de BLEE con mayor prevalencia en todo el mundo (33, 34) y han remplazado en frecuencia a las derivadas de TEM y SHV. Existen muchas otras variantes, minoritarias de BLEE tales como BES, GES-1, VEB y PER (23, 25, 31).

En una década, las  $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M, actualmente con más de 172 variantes, entre variantes plasmídicas y cromosómicas ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/pathogens/submit\\_beta\\_lactamase](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/pathogens/submit_beta_lactamase); Noviembre 2016), agrupadas en 5 *clusters* o sub-familias (Figura 5), siendo CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25, las propuestas como representantes en cada uno de los *clusters*.



**Figura 5:** Dendrograma de la familia BLEE tipo CTX-M. Adaptado de Bonnet *et al.* (30)

Esta expansión, denominada por algunos autores como la “**Pandemia de las CTX-M**”, no solo ha venido dada por el éxito en la supervivencia de clones que portan estas enzimas, sino que ha estado facilitada por el propio entorno genético donde las encontramos, que incluye secuencias de inserción (IS), integrones y transposones. Gracias a las secuencias de inserción y quizás también a una movilización mediada por fagos, las CTX-M han sido movilizadas desde el cromosoma de *Kluyvera* spp. hacia elementos genéticos móviles o movilizables tales como transposones y plásmidos, fácilmente transmisibles por fenómenos de transferencia horizontal (33, 35).

Las BLEE han sido reportadas en bacterias gram negativas, más comúnmente en *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Proteus mirabilis*, así también en otras bacterias entéricas como (*Salmonella*, *K. oxytoca*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*).

Algunas enterobacterias, como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Morganella* y *Serratia* poseen genes cromosomales *AmpC* que confieren resistencia a las mismas cefalosporinas de espectro extendido, por lo cual se las denomina **cefalosporinas o enzimas tipo AmpC** (Grupo 1, clase C). Son las  $\beta$ -lactamasas más abundantes en cuanto a número de microorganismos que la producen. Hidrolizan C1G, C2G, las cefamicinas y en menor medida las C3G. También hidrolizan eficientemente cefoxitina, y combinaciones de  $\beta$ -lactámico e inhibidor; no hidrolizan a cefepime y son inhibidas por cloxacilina, oxacilina y aztreonam (23). La producción de AmpC cromosómica en bacterias gram negativas suele darse a bajo nivel, pero puede suprimirse por inducción con algunos  $\beta$ -lactámicos, especialmente cefoxitina. La presencia de estas enzimas cromosómicas e inducibles es un gran problema en el tratamiento por la posible emergencia de bacterias altamente resistentes. Recientemente, los genes codificantes de estas enzimas fueron encontrados en plásmidos, con capacidad de ser movilizados a bacterias que no producían estas enzimas de forma natural. De esta manera emergieron las **cefalosporinas de tipo AmpC plasmídicas (pAmpC)**, que pueden estar presentes en *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., o *Proteus* spp., están altamente relacionadas con aquellas *AmpC* cromosómicas de *E. cloacae*, *C. freundii* o *Aeromonas* spp, pero son fácilmente transferibles y suelen producir muy alto nivel de resistencia (26). De acuerdo a su origen cromosómico, los genes de las enzimas de tipo AmpC codificadas en plásmidos, se agruparon en 7 familias diferentes, según su secuencia nucleotídica: CIT, derivadas de *C. freundii*; DHA derivadas de *M. morgani*; ACC, relacionado con *Hafnia Alvei*; FOX, derivadas de *A. media*; MOX, derivada de *A. caviae*, EBC derivadas de *E. cloacae* y CFE-1, derivadas de *C. freundii* (36). Se han descrito más de 200 variantes de  $\beta$ -lactamasa de tipo pAmpC, pertenecientes a los siguientes tipos: CMY (136), ACC (5), ACT (38), DHA (23), FOX (12), MIR (18), MOX (11), LAT (1) y CFE-1 (1), (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>, noviembre 2016).

## **$\beta$ -lactamasas, también presentes en animales**

La adquisición de los genes de  $\beta$ -lactamasas tanto en *Salmonella* spp. como *E. coli* parece haber aumentado en los últimos años (15). Los grupos de enzimas frecuentemente detectados en bacterias de origen animal son BLEE y  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC. Las bacterias productoras de BLEE así como de AmpC están frecuentemente presente en el tracto gastrointestinal de los animales (12, 37) y han sido aisladas de cerdos, ganado, pavo, gatos, perros, aves de corral, animales salvajes y caballos (38).

El tracto gastrointestinal de los animales es visto como un importante reservorio para bacterias que producen  $\beta$ -lactamasas, y una fuente potencial de patógenos para los humanos que adquirir estos genes de resistencia (12, 37). Esta es la razón principal por lo que estudios sobre la epidemiología de productores de  $\beta$ -lactamasas son muy importantes para evaluar la contribución de los animales como reservorios potenciales de productores de  $\beta$ -lactamasas clínicamente relevantes. En nuestro país, existe un número limitado de estudios que reportan resistencia en poblaciones bacterianas aisladas desde animales (39), pero sólo un número limitado de estudios han investigado la base molecular de dicha resistencia.

- ✓ TEM-1 fue la BLEA, prevalente en aislamientos de *E. coli* y *Salmonella* spp. (15) recuperada de animales y de alimentos de origen animal en España; pero esto fue importante solo hasta que otras BLEE relevantes para la medicina humana, comenzaran a ser descritas en animales.
- ✓ Numerosos estudios describen la emergencia y diseminación de patógenos zoonóticos produciendo la  $\beta$ -lactamasas de clase C, particularmente CMY-2 (15).

Paulatinamente fueron apareciendo en distintas parte del mundo, descripciones de diferentes sub-familias de CTX-M en animales de producción y de compañía:

- ✓ **CTX-M-1:** la primera enzima CTX-M-1 reportada en *E. coli* fue recuperada de un canino sano en Portugal en el 2004 (40).

- ✓ **CTX-M-2:** la presencia de CTX-M-2 fue observada en productos de origen animal en Japón desde 1999. Entre numerosos aislamientos obtenidos de ganado, cerdos y granjas de pollos, entre 199-2002, se aislaron *E. coli* resistentes a C3G, las cuales producían no solo CTX-M-2, sino también CTX-M-14. CTX-M-2 fue extensivamente reportada en humanos en Japón; aunque no hubo evidencias directas de la transmisión de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-2 desde ganado al humano, pero la presencia de bacterias productoras sobre la superficie de carcasas de bovino y en heces, podrían sugerir que estas bacterias pueden ser transmitidas al humano por medio de la cadena alimentaria (41).
- ✓ **CTX-M-9 y CTX-M-14:** la variante específicamente CTX-M-14 fue detectada en España en el 2000 (42) también en animales de producción, específicamente en un pollo sano a partir de un estudio de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en *Salmonella* spp. Dos aislamientos de *S. Virchow* producían la variante CTX-M-9. Es interesante destacar que desde 1999, variantes cercanamente relacionadas a CTX-M-9 y CTX-M-14 eran prevalentes entre los aislamientos de humanos. En estudios llevados a cabo en España en ese período, *S. Virchow* y *E. coli* (43) con  $\beta$ -lactamasas, CTX-M-9 fueron las prevalentes. No existieron evidencias sustanciales de la transmisión de productores de CTX-M desde animales a humanos a través de la comida, ya que la elevada prevalencia en los aislamientos humanos no puede ser directamente correlacionada con aislamientos esporádicos observados en las poblaciones bacterianas circulantes en animales.

En Argentina, existe un número muy limitado de descripciones de la base molecular de la resistencia de éstas bacterias en animales de producción (44) y no hay datos de los genes responsables de los fenotipos observados. Es por ello que será uno de los temas principales abordados en este trabajo de investigación.

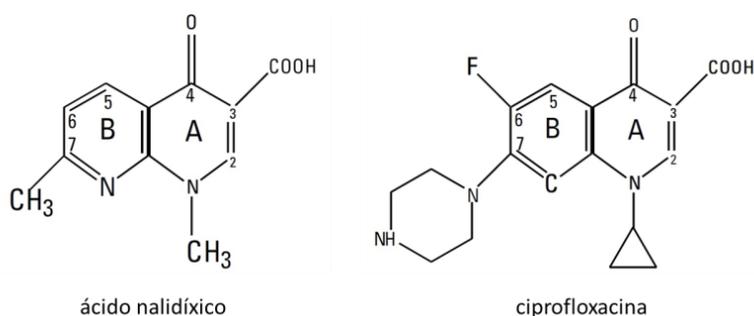
## Quinolonas

### Estructura química y clasificación de las quinolonas

Las **quinolonas** son un grupo de antibióticos sintéticos caracterizados por una estructura bicíclica hetero-aromáticas, constituida por un núcleo piridona- $\beta$  ácido carboxílico y un anillo aromático. El ácido nalidíxico, primera quinolona sintetizada en el año 1962 (45), es el representante principal de este grupo (Figura 6), representa al grupo de las 4-quinolona. Así los compuestos tricíclicos y tetracíclicos son derivados del esqueleto común constituido por la 4-quinolona.

Pese a su potente actividad contra bacterias gram negativas especialmente enterobacterias (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, etc.) el ácido nalidíxico, fue relegado a un segundo plano con la síntesis de las 6 fluoroquinolonas, las cuales presentan un átomo de flúor en la posición 6 del anillo central. Con ello aumenta la capacidad de penetración a la célula bacteriana y se incrementa la afinidad, lo que propicia un aumento de la potencia y el espectro antibacteriano, además de reducir los efectos adversos de manera significativa. (46-48).

La diferencia estructural entre las fluoroquinolonas reside en los sustituyentes en las posiciones 1, 5, 7 y 8. Se destacan las fluoroquinolonas que en la posición 7, ya que poseen un grupo piperacínico (norfloxacin, ciprofloxacina) (Figura 6) o un grupo metil-piperacínico (levofloxacina, ofloxacina). Al poseer este anillo adicional, son 100 veces más activas que las clásicas quinolonas, abarcando bacterias gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias gram positivas como estafilococos.



**Figura 6:** Clasificación estructural de las quinolonas. Quinolona clásica: ácido nalidíxico; Fluoroquinolona: ciprofloxacina.

La cronología de la aparición de las distintas quinolonas, ha permitido clasificarlas en primera, segunda y tercera generación. Recientemente se ha desarrollado un

nuevo grupo de quinolonas denominado de cuarta generación, caracterizadas por la ausencia del átomo de flúor en la posición 6, característico de las fluoroquinolonas. Estos compuestos han sido denominados quinolonas no fluoradas y su espectro de acción se extiende a bacterias tanto Gram-positivas, como gram negativas y anaerobias (49, 50).

Las fluoroquinolonas son usadas para tratar una gran variedad de infecciones bacterianas en humanos, pero también son usadas intensamente en la práctica veterinaria. Por lo cual se las considera actualmente como antimicrobianos críticamente importantes y se propone un uso restringido en medicina veterinaria; algunos países de la Unión Europea han prohibido su uso como promotores de crecimiento.

### **Mecanismos de acción de las quinolonas**

En las bacterias gram negativas, las quinolonas penetran a través de porinas, sobre todo debido a su naturaleza hidrofílica (ciprofloxacina); mientras que para los representantes hidrofóbicos (levofloxacina), el ingreso se puede producir a través de la bicapa lipídica por difusión pasiva a través del peptidoglicano.

El mecanismo de acción de las quinolonas es bastante complejo. Las quinolonas interfieren en la replicación del ADN al bloquear o inhibir las ADN topoisomerasa II y topoisomerasa IV.

La ADN-girasa es una topoisomerasa II que posee la función de mantener un nivel de enrollamiento del ADN que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y la transcripción. También libera enrollamientos negativos en un proceso dependiente de ATP. Es un tetrámero que posee dos subunidades, GyrA y dos subunidades, GyrB, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Esta enzima es la diana primaria de las quinolonas en bacterias gram negativas. La topoisomerasa IV, es la diana primaria en las bacterias gram positivas y tiene una estructura similar, con dos subunidades ParC y dos subunidades ParE, codificadas por los genes *parC* y *parE* (51) y controla la topología del DNA cromosómico, facilitando la replicación del mismo (52).

Una vez que han penetrado en el interior de la bacteria, las quinolonas interaccionan con el complejo formado por las topoisomerasas y el ADN cromosómico bacteriano. Esta unión es irreversible, lo que lleva a la inmovilización de las enzimas conduciendo a la bacteriostasis y en segundo lugar, a la ruptura del ADN doble cadena, con la posterior activación de las vías metabólicas que generan y acumulan ROS (*Reactive Oxygen Species*), responsable de la intensa actividad bactericida de las quinolonas (53).

### Resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas es el resultado final de una acumulación de varios mecanismos bioquímicos cooperativos que resultan de la acumulación de varios eventos genéticos.

Los mecanismos de resistencia a quinolonas incluyen tanto mecanismos cromosómicos como plasmídicos. Dentro de los mecanismos cromosómicos se encuentran las mutaciones en las topoisomerasas dianas, expulsión activa del antibiótico del interior de la célula y la disminución de la permeabilidad de la membrana. Los mecanismos plasmídicos comprenden la (protección de las topoisomerasas diana por las proteínas Qnr, modificación enzimática del antibiótico y expulsión activa del mismo mediante bombas de eflujo (52, 54). Los mecanismos PMQR confieren un ligero aumento en las concentraciones inhibitorias mínimas de las quinolonas, poseen un efecto aditivo y pueden facilitar la adquisición de fenotipo de resistencia completa.

### Mecanismos Cromosómicos: mutaciones asociadas a las topoisomerasas diana de las quinolonas y fluoroquinolonas

En las bacterias gram negativas, el mecanismo principal de resistencia a quinolonas se debe principalmente a sustituciones aminoacídicas generadas por mutaciones en las regiones denominadas **QRDR** (Región determinante de resistencia a quinolona, sus siglas en inglés, *Quinolone Resistance Determining Region*), localizadas principalmente en GyrA y ParC, que modifican la afinidad de unión de la quinolona los complejos ADN-enzima (53, 55).

Tanto en *E. coli* como *Salmonella* spp., las mutaciones asociadas con la resistencia a quinolonas, se encuentran agrupados en una región específica del gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la girasa, el objetivo primario de las quinolonas. La región QRDR en GyrA corresponde a los residuos Ala67-Gln106 (54). Las mutaciones observadas con mayor frecuencia se producen en las posiciones aminoacídicas Ser83 y Asp87 (Tabla 3). Tanto las mutaciones sencillas como las combinaciones de las mismas, provocan diferentes niveles de susceptibilidad reducida a quinolonas y fluoroquinolonas.

En *E. coli*, *Salmonella* spp. y otras bacterias gram negativas, la diana secundaria es la topoisomerasa IV, codificada por los genes *parC* y *parE*. Se ha observado que no aparecen mutaciones en la diana si previamente no está mutado el gen *gyrA*. Los residuos susceptibles de cambios aminoacídicos en ParC son Ser80 y Glu84.

**Tabla 3:** Mutaciones descritas en las subunidades *gyrA* y *parC* en *E. coli*. Adaptado de Ruiz y col., (55).

Gen	Posición del codón	Sustitución
<i>gyrA</i>	Ala51	Val
	Ala67	Ser
	Gly81	Cys, Asp
	Ser83	Leu, Trp, Ala, Val
	Asp87	Asn, Gly, Tyr, His, Val
	Gln106	His, Arg
<i>parC</i>	Gly78	Asp, Lys
	Ser80	Arg, Ile
	Glu84	Gly, Lys, Val

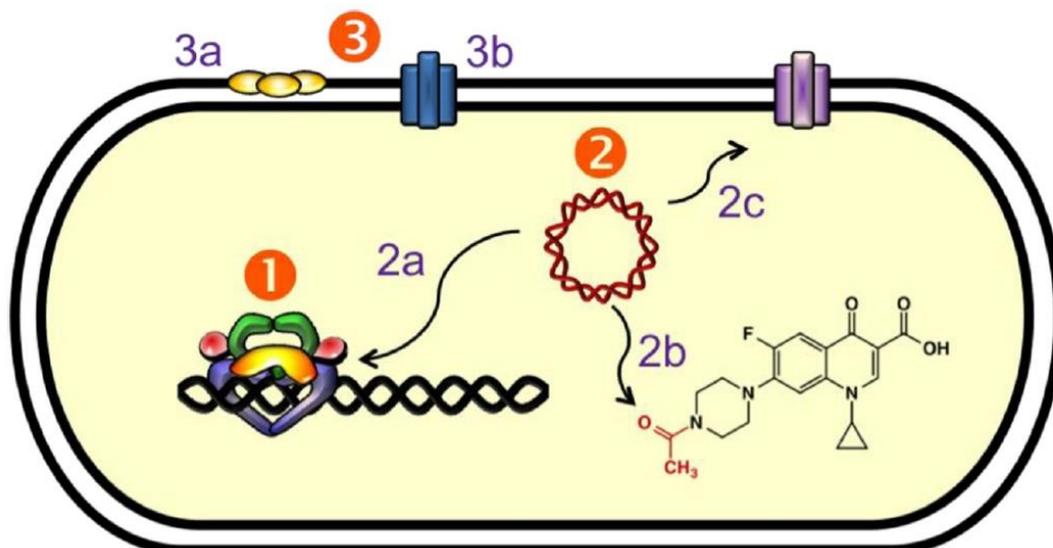
Por sí mismas, estas mutaciones no lograban explicar por qué cepas que presentaban idénticas mutaciones en sus genes de topoisomerasa II mostraban distinto fenotipo de resistencia a quinolonas, por lo que se sospechó que podían existir otros mecanismos adicionales. Entre ellos podemos mencionar: impermeabilidad de la membrana, ya sea por pérdida de porinas o por mutaciones en genes responsables de regular su expresión (49); o sobreexpresión de las bombas de expulsión activa, denominadas bombas de eflujo (55).

## Mecanismos plasmídicos

Los mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas o **PMQR** (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*) fueron descubiertos a fines de los años noventa con la descripción del primer gen que codifica una proteína responsable de conferir bajos niveles de resistencia. Este gen fue llamado *qnr* (*quinolone resistance*) y es actualmente conocido como *qnrA1* (56).

A partir de este momento, fueron describiéndose nuevas variantes alélicas; así como otros mecanismos cuya diseminación estaba mediada por plásmidos (57, 58). Hasta la fecha, han sido identificados además de las proteínas Qnr, la enzima acetil-transferasa (AAC(6')-Ib-cr) y las bombas de eflujo QepA y OqxAB (48, 49) (Figura 7).

A diferencia de los mecanismos de resistencia generados por medio de mutaciones puntuales que se transmite verticalmente de generación a generación, la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos puede transmitirse horizontalmente (a través de conjugación), así como verticalmente. Los plásmidos que confieren resistencia a quinolonas, por lo general llevan genes adicionales que otorgan resistencia a otra clase de antimicrobianos (59).



**Figura 7:** Mecanismos de resistencia a quinolonas. **1-** Resistencia mediada por mutaciones puntuales en la ADN girasa y topoisomerasa. **2-** Resistencia mediada por plásmidos, (**2a**) Proteínas qnr (amarillo): disminuye la unión ADN-topoisomerasa y protege al complejo

enzima-ADN de las quinolonas. **(2b)** AAC(6<sup>+</sup>)-Ib-cr es una acetiltransferasa que acetila el nitrógeno libre sobre el C7 del anillo de ciprofloxacina y norfloxacina, disminuyendo su efectividad. **(2c)** Bombas de eflujo, disminuyen la concentración de quinolonas en la célula. **3-** Resistencia cromosómica, **(3a)** Disminución en la expresión de porinas en especies gram negativas, por lo cual disminuye la absorción del fármaco. **(3b)** Sobreexpresión de bombas de eflujo, disminuyendo la retención del fármaco en la célula. Extraído de Alfred *et al.* (59).

Las quinolonas son antimicrobianos dependientes de la concentración y presentan un cociente inhibitorio alto (CI= concentración máxima sérica/CIM). Por ello suelen dosificarse con un CI entre 8 y 10, no solo para obtener la eficacia terapéutica sino también para prevenir la selección de mutantes (60).

La selección de mutantes ocurre en lo que se denomina “ventana de selección de mutantes” esta zona se encuentra comprendida entre la CIM y la concentración preventiva de mutantes (CPM), donde las bacterias resistentes pueden ser seleccionadas bajo la exposición al antibiótico. O dicho de otra manera, la ventana selectiva de mutantes comprende diferentes rangos de concentraciones del antibiótico donde las bacterias resistentes pueden ser seleccionadas bajo fuerzas selectivas antimicrobianas. Los PMQR incrementan la posibilidad de que los aislamientos que adquirieron el plásmido por THG, entren dentro de los que es la ventana selectiva de mutantes y esto parece facilitar la selección de mutantes resistentes (61).

### *Proteínas de tipo Qnr*

Las proteínas Qnr interactúan con la ADN girasa y topoisomerasa IV, obstruyendo la actividad de las quinolonas. Es decir, estas proteínas podrían reducir la cantidad de complejo holoenzima-ADN, minimizando la posibilidad de que las quinolonas escindan esta estructura y produzcan la ruptura del ADN.

Los genes *qnr* codifican una proteína de 218 aminoácidos que se caracteriza por una serie de repeticiones en tándem de 5 aminoácidos, donde se observa un motivo semi-conservado [(Ser, Thr, Ala o Val), (Asp o Asn), (Leu o Phe), (Ser, Thr o Arg) y (Gly)]. Hasta el momento se conocen seis grandes grupos de proteínas Qnr; agrupadas como QnrA (219aa), QnrB (219aa), QnrC (221 aa), QnrD (214 aa), QnrS (218 aa) y QnrVC (218 aa) en función de su secuencia aminoacídica. Además,

dentro de cada grupo de proteínas, existen distintos alelos de cada gen, que difieren en dos o más aminoácidos (49, 58, 62). La nomenclatura de los genes *qnr* (57) aparecen en la página web ([http://www.lahey.org/qnrStudies\\_](http://www.lahey.org/qnrStudies_) consultada Agosto 2016), donde aparecen todas las variantes descritas hasta el momento. *qnrB* es el determinante más común de la familia *qnr* descrita hasta el momento y es el que posee el mayor número de variantes alélicas (*qnrB1* a *qnrB88*) según la base de datos.

Los genes *qnr* permiten sobrevivir a una bacteria con bajo nivel de resistencia a quinolonas el tiempo suficiente para imponerse durante el tratamiento con fluoroquinolonas, de forma que ayuden a seleccionar mutantes que puedan desarrollar niveles más altos de resistencia a este tipo de antibióticos (49, 58, 62).

Los genes *qnr* pueden estar vehiculizados en plásmidos que poseen una amplia variedad de tamaños (7-320 Kb) y que en la mayoría de los casos portan múltiples determinantes de resistencia como por ejemplo a  $\beta$ -lactámicos, trimetoprima, etc. Estos genes están asociados en muchos casos a integrones, como es el caso de *qnrA1* asociado a integrones complejos de tipo 1; secuencias de inserción (en el caso de genes tipo *qnrB* o *qnrS*) y acompañados de genes que codifican  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC, CTX-M, SHV, etc. (48, 49, 58).

#### *Enzima acetil-transferasa (AAC (6')-Ib-cr)*

Tras el descubrimiento de los genes *qnr*, algunos investigadores se preguntaron por qué los niveles de resistencia a las fluoroquinolonas eran tan distintos cuando se transferían plásmidos portadores de genes *qnr*. Estos fueron los primeros pasos en el descubrimiento de la variante "cr" de la acetil-transferasa AAC (6')-Ib. Por sí misma, esta enzima confiere resistencia a kanamicina, amikacina y tobramicina; pero cuando el gen codificante posee las modificaciones aminoacídicas Trp120Arg y Asp179Tyr, se define la variante *aac(6')-Ib-cr*, una variante bifuncional, que confiere resistencia adicional a fluoroquinolonas como ciprofloxacina y norfloxacina (aumento en 2-4 veces la CIM). La acetilación se produce en el nitrógeno amino en el sustituyente piperazinilo (o pirrolidino), solo las FQ que albergan un grupo piperazinilo no sustituido (tales como ciprofloxacina y norfloxacina) son sustratos de ésta enzima (48, 63). Confieren resistencia de bajo

nivel a ciertas fluoroquinolonas, puede además facilitar la supervivencia de los mutantes del sitio diana con un aumento de 10 veces su CPM (64).

*AAC(6′)-Ib-cr* ha sido descrita en todo el mundo, ya sea sobre el cromosoma sino también sobre plásmidos incluyendo animales de granja (65) y microorganismos ambientales; esto demuestra su gran potencial de diseminación.

### *Bombas de eflujo: QepA y OqxAB*

Las bombas de eflujo son un mecanismo de resistencia a quinolonas bien establecido. Diferentes familias de bombas de eflujo, son capaces de expulsar quinolonas con diferentes afinidades, lo que afecta de diferente manera los valores de CIM finales observados y por lo tanto pueden tener diferente relevancia clínica.

- ✓ La bomba QepA (*quinolone efflux pump*) fue descubierta en Japón en 2002 en una cepa de *E. coli*, está constituida por 511 aminoácidos y pertenece a la familia de las bombas de tipo MFS. Hasta el momento se han descubierto dos variantes que difieren en dos sustituciones aminoacídicas: QepA1 y QepA2, codificadas por los genes *qepA1* y *qepA2*, respectivamente. Estas bombas de eflujo causan un incremento moderado (5 diluciones aproximadamente) en la CIM de ciprofloxacina y norfloxacina, pero no afectan a la actividad de las fluoroquinolonas menos hidrofílicas como pefloxacina, esparfloxacina, gatofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina; ni al ácido nalidíxico por su naturaleza hidrofóbica. Se han descrito varios plásmidos donde se localizan estos genes y se puede decir que en algunos casos su presencia viene asociada a un perfil de multirresistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y  $\beta$ -lactámicos (48, 58, 62).
- ✓ La bomba de eflujo OqxAB fue descubierta en 2003 en una cepa de *E. coli* resistente a olaquinox, usado como promotor de crecimiento en cerdos (66) y ha sido detectada en humanos tanto en microorganismo comensales como patógenos. Pertenece a la familia de las bombas de tipo RND y confiere resistencia también a otros antibióticos, como el cloranfenicol. Afecta a la CIM del ácido nalidíxico y de la ciprofloxacina en 8 y 16 diluciones respectivamente. El gen *oqxAB* es intrínseco de *K. pneumoniae*, donde está presente en el cromosoma (48, 58, 62).

## Resistencia a Colistina

Colistina, es un péptido policatiónico que pertenece a la familia de las polimixinas, es un antimicrobiano efectivo contra la mayoría de las bacterias gram negativas multirresistentes y hoy en día, es considerado una de las últimas drogas de elección para el tratamiento de numerosas enfermedades infecciosas causadas por bacterias resistentes a múltiples antibióticos, como los productores de carbapenemasas (KPC, NDM, OXA-48). Existen dos polimixinas de uso clínico, la polimixina B y la polimixina E (colistina) las cuales sólo difieren en un aminoácido y poseen una actividad biológica comparable (67).

El mecanismo de resistencia a polimixinas, se basa en la modificación del lípido A, componente estructural del LPS, dando como resultado una reducción de la afinidad por la polimixina. Hasta hace poco tiempo, todos los reportes existentes de mecanismos de resistencia a polimixinas eran de codificación cromosómica, por ende no transferibles, (68, 69) que involucran la modulación de un sistema regulatorio de dos componentes (*pmrAB*, *phoPQ*) conduciendo a la modificación del lípido A con restos tales como fosfoetanolamina o 4-amino-4-arabinosa, o en raras instancias se produce también la pérdida total del lipopolisacárido (70).

Recientemente se reportó la emergencia del gen *mcr-1* (*mobile colistin resistance*) que confiere resistencia a colistina y que se encuentra localizado en elementos genéticos móviles. Liu y col., demostraron que la resistencia a la polimixina era singularmente debida al gen *mcr-1* de codificación plasmídica. MCR-1, es una enzima perteneciente a la familia de la fosfoetanolamina transferasa, que modifica la estructura del lípido A de la pared bacteriana, impidiendo de esta forma la interacción de la bacteria con las polimixinas, generando resistencia in vitro e in vivo (67).

En la medicina humana, colistina se encontraba restringida al uso tópico debido a su toxicidad sistémica. Pero en los últimos 10 años, debido al número cada vez mayor de brotes hospitalarios con especies de enterobacterias productoras de carbapenemasas (*E. coli* y *Klebsiella*) y de bacterias multirresistentes como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (es decir, bacterias gram negativas no

fermentadoras) se reintrodujo el tratamiento sistémico con colistina, como último fármaco para el tratamiento de infecciones asociadas a estos microorganismos (71). Colistina, por lo tanto, tiene un papel clave para la salud Pública.

Por otra parte, colistina se ha utilizado regularmente en medicina veterinaria durante décadas. Se usa ampliamente como promotor de crecimiento en la producción intensiva de cerdos como de pollos parrilleros, el cual es adicionado en el alimento en concentraciones subinhibitorias mediante largos períodos de tiempo (72, 73), situación que es completamente favorable para la selección de microorganismos resistentes a antimicrobianos. En las producciones intensivas se administra normalmente por vía oral a todo el grupo de animales. También es de importancia terapéutica para el tratamiento de infecciones gastrointestinales de bacterias gram negativas, en ciertos animales productores de alimentos.

*El gen mcr-1 se asoció a aislamientos de E. coli, K. pneumoniae y Salmonella spp. recuperados de animales de consumo, y en menor medida en aislamientos recuperados de alimentos y pacientes ambulatorios y hospitalizados (74, 75). En Argentina en diciembre del 2015, fue descripta la emergencia y diseminación de aislamientos clínicos productores de mcr-1 (76). Hasta el momento, no ha sido reportada la presencia de este mecanismo en aislamientos de origen animal y en alimentos en Argentina.*

### **Transferencia horizontal de genes**

La adquisición de genes extraños o elementos genéticos móviles por organismos o entre especies, se conoce como transferencia horizontal de genes (*Horizontal Gene Transfer, HGT*). La transferencia horizontal de genes depende críticamente de factores internos y ambientales. La presencia de antimicrobianos en el medio ambiente ejerce una presión que induce la respuesta al estrés en la comunidad microbiana promoviendo la HGT, como una respuesta de adaptación bacteriana (2).

La importancia de la transferencia horizontal de genes fue reconocida cuando se encontraron bacterias que adquirieron múltiples genes de resistencia a

antimicrobianos; y con los recientes avances en la secuenciación de genoma completo de bacterias ha fomentado la comprensión de que la HGT es un factor importante en la evolución bacteriana.

En este proceso juegan un papel muy importante los elementos genéticos móviles (EGMs) como los plásmidos, integrones/casetes genéticos y transposones. Muchos estudios han descrito genes de resistencia a antimicrobianos como parte de plásmidos autotransferibles o de elementos transponibles y que la transferencia de resistencia se produce tanto entre bacterias relacionadas como no relacionadas (77).

Entre los elementos de diseminación destacaremos los plásmidos, debido a su importancia en la transferencia de resistencia a antibióticos, siendo los responsables de la propagación horizontal de la resistencia entre bacterias (78).

**Los plásmidos** son moléculas de ADN extracromosómicos, normalmente circulares con la capacidad de autorreplicarse y distribuirse entre las células hijas durante la división celular. Su tamaño varía desde uno hasta varios cientos de kilobases (Kb). Su número también puede variar, dependiendo del tipo, desde una sola copia hasta decenas por célula. Su capacidad de autorreplicarse y mantenerse dentro de la bacteria hospedadora se debe a la existencia de ciertos elementos genéticos involucrados en la replicación plasmídica, los cuales se agrupan en una unidad genética llama replicón.

El replicón, es la porción mínima del plásmido que se replica con el número de copias característico del plásmido parental. Comprende una región entre 2-3 Kb, que contiene los genes que codifican las proteínas de control de inicio de la replicación (cop e inc), así como las proteínas involucradas en el inicio de la replicación (rep) y otros elementos de control como RNA antisentido y secuencias específicas de unión a las proteínas que colaboran en el inicio de la replicación (79).

Algunos plásmidos portan genes que les permiten movilizarse de una bacteria a la otra mediante mecanismos de conjugación, son denominados plásmidos autotransmisibles o conjugativos. Otros plásmidos han perdido estos genes, por lo

que necesitan la presencia y los mecanismos de plásmidos conjugativos para poder movilizarse y diseminarse, se denominan plásmidos movilizables.

La conjugación se puede considerar como un proceso que coordina una replicación círculo rodante con un transportador macromolecular. Para que esta transferencia de ADN tenga lugar, se requiere un contacto directo entre la célula donadora y la receptora. Los plásmidos conjugativos, producen una estructura proteica, llamada *pilus* sexual que facilita el proceso. Pero existen diferentes sistemas de transferencia por conjugación, estos sistemas están codificados por los genes *tra*. Estos genes están localizados distantes de la región *ori*, donde se concentran los genes implicados en el proceso de partición, replicación y control.

En el caso de las bacterias gram negativas se necesitan tres componentes esenciales: el transferosoma, formado por un sistema de secreción tipo 4 (SST4) que se encarga de la síntesis del pilus sexual y ayuda a la inyección del ADN; el relaxosoma, un conjunto de proteínas que procesan el ADN; y una proteína acopladora que conecta ambas entidades (80). Todos estos procesos y su regulación están codificados por genes localizados en la región *Tra*.

Como se mencionó anteriormente, los plásmidos conjugativos pueden guiar la movilización de otros que no sean autotransferibles, plásmidos movilizables, promoviendo su transporte hacia la célula receptora a través del SST4 (81, 82). Los plásmidos movilizables carecen de los genes que se requieren para el emparejamiento celular, pero poseen las necesarias para realizar la movilización.

Los plásmidos que confieren fenotipos de multirresistencia son normalmente de gran tamaño (>50 Kb), conjugativos y poseen sofisticados mecanismos para controlar el número de copias plasmídicas, regulando así la tasa de replicación (83). El estricto control de la replicación implica que dos plásmidos que comparten el mismo replicón, no pueden ser propagadas de forma estable en la misma célula. Este fenómeno se conoce incompatibilidad plasmídica, y se ha utilizado para clasificar plásmidos en grupos homogéneos.

Los plásmidos que comparten el mismo sistema de control son incompatibles, mientras que plásmidos con diferentes controles son mutuamente compatibles.

Dos plásmidos que pertenecen al mismo grupo de Inc, no puede ser propagado en la misma línea celular (79). No obstante, la presencia de más de un plásmido en una misma célula es un hecho frecuente en el mundo bacteriano (84). La identificación de plásmidos mediante la determinación del grupo de incompatibilidad, es frecuentemente usada para clasificarlos. Este método funciona como una herramienta importante para rastrear la difusión de plásmidos confiriendo resistencia a antimicrobianos, y también es útil para seguir la evolución y propagación de plásmidos emergentes.

Diferentes técnicas fueron empleadas para determinar el grupo de incompatibilidad, en 1988 Courturier *y col.*, desarrollaron un método para la identificación de los principales replicones en *Enterobacteriaceae*, el cual se basaba en la hibridación con sondas que reconocían 19 replicones básicos (79). Carattoli *y col.*, propusieron la caracterización por métodos basados en amplificación por PCR, desarrollaron 5 PCR *multiplex* y 3 PCR simples, basadas en la tipificación de los replicones (PCR Inc/rep o PBRT) de los principales grupos de incompatibilidad de los plásmidos que circulan entre las enterobacterias. PBRT reconoce los replicones de los grupos FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F y FIIA (84).

Existen determinados grupos de incompatibilidad (IncF, IncI1, IncA/C y IncHI2), que son más frecuentes con respecto al resto y se pueden caracterizar mediante *Plasmid Multi Locus Sequence Typing* (pMLST- <http://pubmlst.org/plasmid/>). Esta subtipificación permite identificar a plásmidos similares de diferentes fuentes y orígenes, aportando así al estudio molecular de la epidemiología de la resistencia (85).

### **Sistemas toxina/antitoxina (TA)**

Muchos plásmidos codifican para sistemas de adicción, pequeños módulos genéticos implicados en el mantenimiento de los plásmidos en la descendencia. Los sistemas de adicción basados en **factores toxina/antitoxina (TA)**, que son capaces de matar a las células hijas que no hereden el plásmido durante la división celular. Estos sistemas promueven eficientemente el mantenimiento del plásmido

en la población bacteriana independientemente de la presencia de presión de selección.

La presencia del plásmido asegura una producción constante de la antitoxina, quedando la toxina bloqueada. Sin embargo, la pérdida del plásmido en el que esta codificado el sistema TA, impide la síntesis de nueva antitoxina, con lo que la toxina, bioquímicamente más estable en la célula, queda libre para atacar su diana celular. Esto provoca la bacteriostasis y/o muerte de las bacterias libres de plásmido.

El gen de la toxina codifica una proteína estable, mientras que la antitoxina, es una proteína lábil o una especie de ARN antisentido no traducida (86). La antitoxina es bioquímicamente más inestable que la toxina, por lo que necesita una producción constante de la primera para mantener silenciada la segunda. Esta cualidad es la que permite actuar a los sistemas TA como módulos de estabilidad y/o adicción.

Basados en la naturaleza de la antitoxina y su modo de acción, los sistemas toxina/antitoxina son divididos en 3 clases: tipo I, II y III. Las antitoxinas tipo I y III son pequeños ARNs que inhiben la expresión de la toxina (tipo I) o su actividad (tipo III) (86-88). Los sistemas de tipo II son los más estudiados y constan de antitoxinas de tipo proteicas que inactivan a la toxina por formación de complejos proteína-proteína (89).

La organización genética de los sistemas toxina/antitoxina de tipo II es bastante conservada y comprenden dos genes organizados en un operón, con una pequeña región intergénica que los separa. Ambos genes codifican para proteínas de tamaño pequeño, entre 31-204 aminoácidos para las antitoxinas y de 41-206 aminoácidos para toxinas (90). La clasificación de los sistemas de tipo II, consta actualmente de 10 familias de toxina/antitoxina, basadas en similitud de aminoácidos de las toxinas que a su vez se asocian con una familia específica de antitoxina (86, 90).

La antitoxina actúa comúnmente como autorrepresor del operón, cumple una función de represor “débil” incapaz de impedir completamente la transcripción del

operón. En las antitoxinas de naturaleza proteica, el dominio amino-terminal interactúa con el ADN y la región carboxi-terminal es necesaria para la interacción y neutralización con la toxina. En ausencia de toxina, las antitoxinas suelen interactuar con secuencias nucleotídicas discretas en la región promotora-operadora del operón TA. Sin embargo, esta unión proteína-ADN es lábil. La interacción TA permite la formación de un complejo represor completamente funcional, reduciéndose así la transcripción de ambos genes. Este efecto permite mantener unos niveles de toxina en la célula lo suficientemente bajos como para no interferir en el crecimiento normal de ésta, pero suficientemente altos como para responder rápidamente ante situaciones en el que el sistema debe activarse.

De este modo, estos sistemas contribuyen a un aparente nivel de estabilización del plásmido en la población. A su vez, se ha descrito que los plásmidos portadores del sistema toxina/antitoxina son capaces de desplazar plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad que carezcan de estos sistemas (91).

## Objetivo General

Analizar los mecanismos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G) y a fluoroquinolonas (FQ) en enterobacterias aisladas de animales de producción en Argentina y evaluar los vehículos implicados en su emergencia y diseminación.

## Objetivos Específicos

- ✓ Evaluar el perfil de sensibilidad a C3G, FQ, colistina y otros antimicrobianos en aislamientos de *Salmonella* spp. y *E. coli* recuperadas de establecimientos de producción avícola, bovinos, equinos, entre otros y determinar los niveles de resistencia observados en las distintas poblaciones analizadas.
- ✓ Caracterizar los mecanismos enzimáticos implicados en la resistencia a C3G (BLEE y AmpCp); los determinantes de resistencia a quinolonas cromosómicos y plasmídicos (PMQR) y aquellos involucrados en la resistencia a colistina en poblaciones de interés.
- ✓ Caracterizar los plásmidos en los aislamientos de interés (con resistencia a C3G, determinantes PMQR y a colistina), estimando los tamaños, grupo de incompatibilidad y su capacidad de movilización.
- ✓ Tipificar los aislamientos relevantes mediante la determinación de diferentes marcadores de clonalidad y virulencia.

# Materiales y Métodos

## Determinación de la sensibilidad a Antimicrobianos

### Ensayo de Difusión en medio sólido

Con el objetivo de analizar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos (ATM) se sometió a todos los aislamientos a la prueba de difusión en placas de agar Mueller-Hinton (MHA), según recomendaciones del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)(32). A partir de un cultivo puro se preparó una suspensión bacteriana en solución salina con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland, conteniendo aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml. Dicha suspensión se inoculó homogéneamente con un hisopo estéril sobre toda la superficie de una placa de agar MHA.

Se empleó un panel de 23 discos comerciales de ATM (Neo-Sensitabs, Rosco Diagnostica A/S, Denmark), que fueron: ampicilina (AMP), cefalotina (CEP), cefuroxima (CXM), ceftriazona (CRO), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefoxitina (FOX), ceftiofur (CFT), cefepima (FEP), aztreonam (AZT), imipenem (IMI), meropenem (MEM), ácido nalidíxico (NAL), enrofloxacina (ENR), ciprofloxacina (CIP), amicacina (AMI), kanamicina (KA), gentamicina (GEN), estreptomycin (ST), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLR), colistina (CO) y trimetoprima-sulfametoxazol (SXT). Los puntos de corte para cada antimicrobiano se especifican en el Anexo.

Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas. Al cabo de dicho tiempo se midieron los halos de inhibición. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo los puntos de corte propuestos por el CLSI para todos los ATM ensayados, con la excepción de ceftiofur (CFT) y enrofloxacina (ENR), donde se emplearon los puntos de cortes del CLSL (92). *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fueron utilizadas como cepas control.

### Ensayo de Dilución en Medio Líquido: Determinación CIM

La CIM de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas fue determinada por dilución en medio líquido, siguiendo las recomendaciones del CLSI (32), mientras que para colistina, se siguió las recomendaciones del EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- version 6.0)(resistente > 2  $\mu\text{g/ml}$ ).

El rango de concentraciones ensayado fue entre 0,5  $\mu\text{g/ml}$ - 256  $\mu\text{g/ml}$  para los  $\beta$ -lactámicos, 0,125  $\mu\text{g/ml}$ - 64  $\mu\text{g/ml}$  para ácido nalidíxico, y de 0,015  $\mu\text{g/ml}$ - 8  $\mu\text{g/ml}$  para las fluoroquinolonas, ciprofloxacina y enrofloxacin. En todos los casos se utilizó como control *Escherichia coli* ATCC 25922.

### Determinación de co-resistencia

El coeficiente de MARs (*Multiple Antibiotic Resistance*), es la forma de representar la co-resistencia a los antimicrobianos ensayados pertenecientes a diferentes familias. Se calculó según la fórmula:

**MARs** = Número de antimicrobianos resistentes /total de antimicrobianos ensayados.

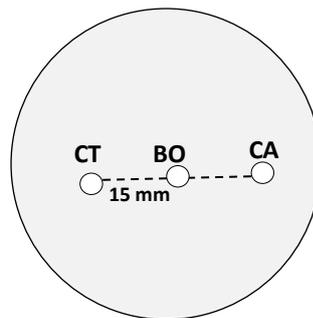
### Detección fenotípica de $\beta$ -lactamasas

Todos aquellos aislamientos de *S. enterica* y *E. coli* que mostraron resistencia a AMP y a C3G, se sometieron a ensayos fenotípicos confirmatorios para detectar la probable producción de  $\beta$ -lactamasas de tipo BLEA, AmpC o BLEE.

### Ensayo Fenotípico de Detección de AmpC

La presencia de una enzima tipo AmpC, se llevó a cabo la prueba de sinergia colocando un disco con ácido borónico (BOR, 300  $\mu\text{g}$ ) a 15 mm de distancia borde a borde de discos conteniendo cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ), respectivamente, sobre placas de MHA inoculado con el aislamiento bacteriano a ensayar inoculando con  $10^8$  UFC/ml (Figura 8) .

Las enzimas AmpC son inhibidas por el ácido borónico, y su presencia se evidencia por la formación de un efecto sinérgico entre los discos, es decir cuando se produce un agrandamiento en la zona adyacente del disco conteniendo el antibiótico y el disco conteniendo el inhibidor (efecto huevo); se considera un resultado positivo y por lo tanto se sospecha la posible producción de AmpC  $\beta$ -lactamasas.

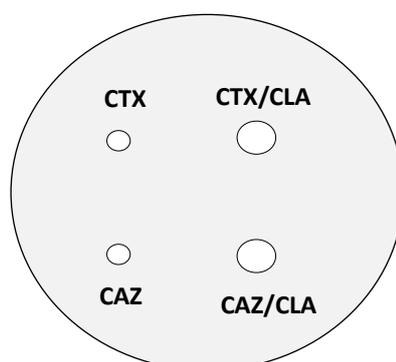


**Figura 8:** Disposición de discos de ATM para la detección fenotípica de la producción de AmpC.

#### Ensayo Fenotípico de Detección de BLEE

Según propone el CLSI, cuando se observa la ampliación de la zona de inhibición ( $\geq 5$  mm) de discos conteniendo combinaciones de sustrato/inhibidor, como CTX/ácido clavulánico (CLA) y CAZ/ácido clavulánico (CLA) (Figura 9) al compararlo con la zona del disco que contiene sustrato solamente, se demuestra la presencia de una  $\beta$ -lactamasas BLEE.

Se observa un aumento en el área de inhibición de antibiótico, debido a que el ácido clavulánico no es capaz de inhibir la actividad de las BLEE de clase molecular A; considerándose un resultado positivo y por lo tanto se detecta la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).



**Figura 9:** Disposición de discos de ATM para la detección fenotípica en productores de BLEE.

## Ensayo fenotípico de Detección de Sensibilidad a Fluoroquinolonas

Para determinar la sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas en enterobacterias se siguió el protocolo consensuado de la RED Whonet Argentina (93) que recomienda la incorporación de discos de **pefloxacina** (5 µg/ml) conjuntamente con discos de ácido nalidíxico y ciprofloxacina; para detectar sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas. Los criterios empleados para la interpretación e informe de los fenotipos de sensibilidad, sensibilidad disminuida y resistencia a FQ, para el método de difusión con discos, se detalla a continuación.

### Método de difusión con discos

Los resultados se interpretaron de acuerdo a los siguientes criterios:

Fenotipo	CIP (mm)	NAL (mm)	PEF (mm)	Interpretación	Informe de CIP
1	≥ 31	≥ 21	≥ 24	Fenotipo Salvaje	Sensible
2	≤20	≤20	≤23	Combinación de mecanismos de Resistencia	Resistente
3	21-30	≤20	≤23	Sensibilidad disminuida a	Sensibilidad
4		≥ 21	≥ 24	FQ	disminuida

En la tabla se aclaran los fenotipos más comunes para quinolonas en enterobacterias.

El fenotipo 4 correspondería a la producción de la enzima *aac(6')-Ib-cr* aminoglucósidos, CIP y NOR. Este fenotipo debe confirmarse con la evaluación de LEV. Un halo de LEV superior al de CIP por 5 mm o más, indicaría la presencia de este mecanismo. Ni el disco de PEF, ni el disco de NAL son capaces de detectar este mecanismo.

## Caracterización molecular de β-lactamasas

El análisis genético para caracterizar los mecanismos de resistencia se realizó mediante PCR y posterior secuenciación de los productos de amplificación obtenidos.

#### **Extracción de ADN total por el método de lisis**

El ADN genómico total se extrajo mediante termólisis. Se tomaron entre 4-5 colonias y se suspendieron en 200 µl de agua libre de ADNasa y RNasa estéril (Gibco). La lisis se realizó a baño de agua en ebullición durante 10 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 13.000 rpm en microcentrífuga, se recuperan 180 µl del sobrenadante, que se conservaron a -20° C para su posterior utilización.

#### **Extracción de ADN total mediante Kit de extracción**

En los ensayos en los que se requirió preparaciones de ADN genómico o plasmídico de alta pureza, se utilizó diversos kits comerciales como DNeasy Blood & Tissue Lit (Qiagen), ADN Puriprep-S kit-Highway y ADN Puriprep-P kit-Highway (Inbio Highway). En todos los casos se siguieron las indicaciones provistas por el fabricante.

#### **Extracción de ADN plasmídico**

La obtención de ADN plasmídico se llevó a cabo por la técnica de extracción con fenol cloroformo propuesta por Kado y *col.*, (94) Esta técnica permite la extracción de plásmidos de elevado peso molecular que pueden ser posteriormente utilizados como templado para PCRs, en ensayos de transformación y/o en ensayos de restricción con enzimas, entre otros usos.

- ✓ Se repicó el aislamiento bajo estudio en 3 ml de caldo LB con el antibiótico adecuado. Se incubó ON a 37°C.
- ✓ Se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos 3 ml de un cultivo ON en caldo LB.
- ✓ Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 1 ml de buffer E.

- ✓ Se agregó a la suspensión bacteriana 2 ml de buffer de lisis suplementado con 20 µg de RNAsa. Mezcló suavemente por inversión.
- ✓ Se incubó a 58° C durante 20 minutos.
- ✓ Se añadió 1 ml de mezcla de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1). Luego, se mezcló utilizando vortex.
- ✓ Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos.
- ✓ Se transfirió la fase acuosa, que contiene el ADN plásmidico, colocando 400 µl en tubos eppendorf.
- ✓ Se añadió 40 µl de NaCl 5M (Concentración final: 0,3-0,5 M) y 800 µl de etanol 96% (2 volúmenes).
- ✓ Se incubó ON a -20 °C para que precipite el ADN plasmídico.
- ✓ Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos.
- ✓ Se lavó con 1 ml de etanol 70%. No mezclar ni remover el pellet, y se volvió a centrifugar.
- ✓ Se extrajo el alcohol y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente.
- ✓ Se resuspendió en 50-100 µl de agua MilliQ estéril (Gibco).

Buffers y soluciones necesarias para las extracciones, se detallan en el Anexo.

### **Detección de mecanismos de resistencia por amplificación génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Como templado se utilizó ADN total obtenido a partir de lisis de colonia así como el ADN plasmídico extraído por la técnica de Kado *y col.*, (94).

Para identificar los distintos grupos de β-lactamasas, se emplearon distintas condiciones de PCR y diferentes *primers*, que se presentan a continuación:

- ✓ PCR simples para determinar *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-2 y-10</sub>, *bla*<sub>PER-1 y -2</sub>. La presencia de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, fue determinada con primers universales para *bla*<sub>CTX-M-like</sub> y luego se realizaron reacciones de PCR empleando primers específicos para los diferentes determinantes *bla*<sub>CTX-M-1, M-2, M-8, M-9 Y M-25</sub>.  
Tabla 3.

**Tabla 3:** Se especifican los *primers* empleados para determinar las diferentes  $\beta$ -lactamasas

<i>Primers</i>	Secuencia (5'-3')	Gen target	Producto (bp)	Referencias
<i>Bla</i> <sub>TEM-F</sub>	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	1080	(95)
<i>Bla</i> <sub>TEM-R</sub>	GACAGTTACCAATGCTTAATCA			
<i>bla</i> <sub>SHV-F</sub>	TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	600	(95)
<i>bla</i> <sub>SHV-R</sub>	AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG			
<b>OXA 2A</b>	CCTGCATCGACATTCAAGATA	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>	468	Cepario
<b>OXA 2B</b>	CTCAACCCATCCTACCCACCA			
<b>OXA 10A</b>	GCCATGAAAAACATTTGCCGC	<i>bla</i> <sub>OXA-10</sub>	805	Cepario
<b>OXA 10B</b>	GCCACCAATGATGCCCTCAC			
<b>bla</b> <sub>PER1-F</sub>	GGGCTTAGGGCAGAAAGCTTTTTC	<i>bla</i> <sub>PER-1</sub>	900-1000	Cepario
<b>bla</b> <sub>PER1-R</sub>	AAGCTGTAGTTACTGCCTGCACGC			
<b>bla</b> <sub>PER-2F</sub>	TGT GTT TTC ACC GCT TCT GCT CTG	PER-2	880	(95)
<b>bla</b> <sub>PER-2R</sub>	AGCTCA AACTGA TAA GCC GCT TG			
<b>CTX-M GRAL F</b>	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-like</sub>	500	Cepario
<b>CTX-M GRAL R</b>	CCGCTGCCGCTYTTATCVCCBAC			
<b>CTX-MU F</b>	CGA TGT GCA GTA CCA GTA	<i>bla</i> <sub>CTX-M-like</sub>	585	(96)
<b>CTX-MU R</b>	TTA GTG ACC AGA ATC AGC GC			
<b>Primer 2.1</b>	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	415	
<b>Primer 3.1</b>	AGCTTATTCATCGCCACGTT			
<b>Primer 2.2</b>	CGACGCTACCCCTGCTATT	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	552	
<b>Primer 3.2</b>	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG			
<b>Primer 2.9</b>	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	209	(97)
<b>Primer 3.9</b>	ATTGGAAAGCGTTCATCACC			
<b>Primer 8</b>	TCGCGTTAAGCGGATGATGC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	688	
<b>Primer 8.25</b>	AAC CCACGA TGT GGG TAGC			
<b>Primer 25</b>	GCA CGA TGA CAT TCG GG	<i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	347	
<b>Primer 8.25</b>	AAC CCACGA TGT GGG TAGC			
<b>CTX-M-1 CF</b>	ATGGTTAAAAAATCACTGC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	864	Cepario
<b>CTX-M-1 CR</b>	GGTGACGATTTTAGCCGC			
<b>CTX-M-1 FpK</b>	AAATGGTTAAAAAATCACTGC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1/3</sub>	876	Cepario, <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (3-15-12-96-37), grupo filogenético CTX-M 1/3
<b>CTX-M-1 RpK</b>	CTACAAACCGTGGTGACGAT			
<b>bla1</b>	TTAATGATGACTCAGAGCATTC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	910	(95)
<b>bla2</b>	GATACCTCGCTCCATTATTGC			
<b>CTX-M-2 FpK</b>	TAATGATGACTCAGAGCATTCGC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	900	Cepario, <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (2), grupo filogenético CTX-M-2
<b>CTX-M-2 RpK</b>	GCATCAGAAAACCGTGGGTTACG			
<b>CTX-M-8 F</b>	TGAATACTTCAGCCACACG	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	1184	Cepario
<b>CTX-M-8 R</b>	TAGAATTAATAACCGTCGGT			
<b>CTX-M-8 FpK</b>	AGATGATGAGACATCGCGTTAAGC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	1184	Cepario, <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (8), grupo filogenético CTX-M-8
<b>CTX-M-8 RpK</b>	TTAATAACCGTGGTGACG			

<b>CTX-M-9 CF</b>	ATGGTGACAAAGAGAGTGC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	876	Cepario
<b>CTX-M-9C R</b>	TCACAGCCCTTCGGCGATG			
<b>CTX-M-9 FpK</b>	AGATGGTGACAAAGAGAGTGC	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	876	Cepario, <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> (9), grupo filogenético CTX-M-9
<b>CTX-M-9 RpK</b>	TTACAGCCCTTCGGCGATG			

- ✓ La técnica “*gold standard*” para la detección de  $\beta$ -lactamasa tipo AmpC, es la PCR *multiplex* desarrollada por Pérez-Hanson (98), en la cual se empleó 6 pares de *primers* específicos que detectan la mayoría de los genes codificantes de pAmpC, determinando la presencia de los alelos ACC, CIT, DHA, EBC, FOX y MOX (Tabla 4).

Dado que los ensayos fenotípicos descritos anteriormente no pueden distinguir entre familias de pAmpC (plasmídicas), o incluso de las cAmpC (cromosómicas), se llevó a cabo la identificación de los genes codificantes presentes en los aislamientos por medio de ésta técnica. Resulta adecuada para el estudio de aislamientos pertenecientes a enterobacterias no productoras de cAmpC, como por ejemplo *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* o *S. enterica*, en los cuales puede realizarse sobre ADN total o plasmídico. En aquellas especies productoras de cAmpC, los genes codificantes pueden interferir en la detección de AmpC, siendo necesario emplear templados de ADN plasmídico.

Para determinar el gen completo de *bla*<sub>CMY</sub>, se realizó una PCR empleando *primers* específicos denominados CMY-F y CMY-R.

**Tabla 4:** Se especifican los *primers* empleados para determinar las diferentes  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC.

<i>Primers</i>	Secuencia (5'-3')	Gen target	Producto (bp)	Referencias
<b>MOXMF</b>	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	<i>bla</i> <sub>pAmpC</sub>	520	(98)
<b>MOXMR</b>	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C			
<b>CITMF</b>	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA		462	
<b>CITMR</b>	TTT CTC CTG AAC GTC GCT GGC			
<b>DHAMF</b>	AAC TTT CAC AGC TGT GCT GGG T		405	
<b>DHAMR</b>	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC			
<b>ACCMF</b>	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA		346	

<b>ACCMR</b>	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC			
<b>EBCMF</b>	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG		302	
<b>EBCMR</b>	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT			
<b>FOXMF</b>	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G		190	
<b>FOXMR</b>	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG			
<b>CMY-F</b>	ATGATGAAAAAATCGTTATGCT	<i>bla<sub>CMY</sub></i>	1146	(99)
<b>CMY-R</b>	TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG			

Se emplearon distintos *primers* para la identificación de mutaciones QRDR:

- ✓ PCR simples para detectar mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*. La presencia de los genes fue determinada con *primers* específicos (Tabla 5).

**Tabla 5:** *Primers* empleados para detectar mutaciones en la región QRDR

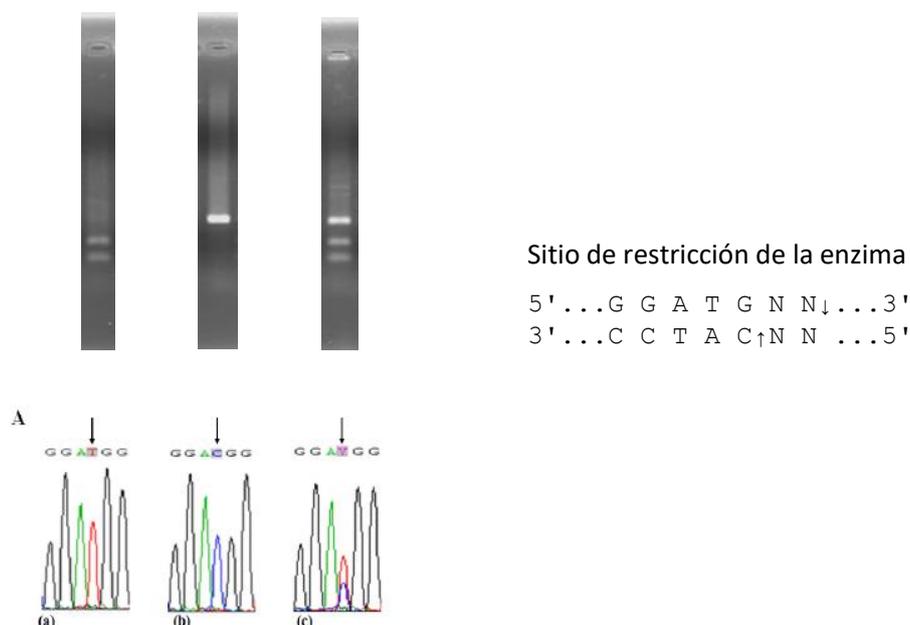
<i>Primers</i>	Secuencia (5´-3´)	Gen target	Producto (bp)	Referencias
<b>stGyrA1</b>	CGTTGGTGACGTAATCGGTA	<i>gyrA</i>	251	(100)
<b>stGyrA2</b>	CCGTACCGTCATAGTTATCC			
<b>GyrAEcC- F</b>	GCCATACCTACGGGGATAACC	<i>gyrA</i>	344	(101)
<b>GyrAEcC- R</b>	AAATCT GCC CGT GTC GTT GGT			
<b>parC-F C</b>	CTG AAT GCC AGC GCC AAATT	<i>parC</i>	183	(101)
<b>parC-R C</b>	GCG AAC GAT TTC GGATCG TC			
<b>stmparC1</b>	CTATGC GAT GTC AGA GCT G	<i>parC</i>	270	(100)
<b>stmparC2</b>	TAA CAG CAG CTC GGC GTATT			

El análisis de las mutaciones para las regiones QRDR de los genes *gyrA* y *parC*, se realizó por ensamblaje de los fragmentos obtenidos mediante el programa Vector NT11 (*Life Technologies*) y posterior traducción de la secuencias a proteína, utilizando el programa Expasy (Bioinformatics Resource Portal- translate tool, <http://web.expasy.org/translate/>).

La presencia o ausencia de mutaciones en la región QRDR se realizó por alineamiento con secuencias de referencia de *E. coli* K12 (NC\_000913.2) y/o *Salmonella* NTC74, mediante el programa Uniprot Align(<http://www.uniprot.org/>).

Se empleó distintos *primers* para la identificación de genes PMQR (102-107):

- ✓ PCR simples para detectar la presencia de genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *oqxA*, *oqxB* y *qepA*. La presencia de los genes fue determinada empleando *primers* específicos. Las condiciones de reacción y los *primers* empleados se detallan en la Tabla 6.
  
- ✓ Para el gen *qnrB* se empleó tres tipos diferentes de *primers*.
  - *Primers* qnrB: diseñado para amplificar fragmentos internos del gen. Se empleó como tamiz.
  - *Primers* qnrBIF: diseñado para amplificar la totalidad del gen *qnrB* de alelos más largos y qnrBCF: diseñado para amplificar la totalidad del gen *qnrB* de alelos más cortos. Estos *primers* comparten el mismo cebador reverso. El amplicón del tamaño esperado obtenido fue secuenciado en todos los casos.
  
- ✓ Para detectar la variante de la enzima modificadora de aminoglucósidos, *aac(6)-lb-cr*, se realizó PCR simple con *primers* específicos y posteriormente digestión mediante RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphims*) empleando la enzima *BseGI*. Las condiciones de digestión (Vf de 15 µl) fueron las siguientes:
  - ✓ 1,5 µl de *Buffer* Tango amarillo 10X
  - ✓ 9 µl de agua MQ
  - ✓ 0,5 µl de la enzima *BseGI* 10U/µl (Fermentas)Se incubó durante tres horas y se corrió en un gel al 1.5 %. Los posibles patrones que pueden ser obtenidos se observan en la Figura 10.



**Figura 10:** Patrones de restricción obtenidos con *BseGI*. (a) gen *aac(6′)-Ib* digerido con la enzima, el electroferograma muestra el sitio de corte la enzima de restricción. (b) gen *aac(6′)-Ib-cr* presenta cambios de nucleótido el sitio de corte de la enzima (T304C/A y G535C), evitando el reconocimiento por parte de la enzima. (c) patrón obtenido en un aislamiento con duplicaciones génicas que presenta *aac(6′)-Ib* como la variante modificadora de fluoroquinolonas con su respectivo electroferograma.

Aquellos fragmentos que no fueron digeridos por la enzima, se enviaron a secuenciar para así poder confirmar la presencia e identidad del gen.

- ✓ Se detectó la presencia de la bomba de eflujo *qepA* se realizó PCR simple *Hot Star*, debido al alto porcentaje de guanina y citosina (GC) que contiene el gen que la codifica.

**Tabla 6:** *Primers* empleados para la detección de los diferentes determinantes PMQR

<i>Primers</i>	Secuencia (5′-3′)	Gen target	Producto (bp)	Referencias
<b>qnrA-F</b>	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	580	(102)
<b>qnrA-R</b>	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
<b>qnrS-F</b>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS</i>	428	(102)
<b>qnrS-R</b>	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG			
<b>qnrC-F</b>	GGTTGTACATTTATTGAATCG	<i>qnrC</i>	330	(104)
<b>qnrC-R</b>	CACCTACCCATTTATTTTCA			
<b>qnrD-F</b>	CGAGATCAATTTACGGGAATA	<i>qnrD</i>	582	(105)

<b>qnrD-R</b>	AACAAGCTGAAGCGCCTG			
<b>qnrB-F</b>	GGMATHGAAAATCGCCACTG	<i>qnrB</i>	264	(102)
<b>qnrB-R</b>	TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA			
<b>qnrBIF-F</b>	ATGWYGYCATTACTGTATA	<i>qnrBIF</i>	676	(103)
<b>qnrBIF-R</b>	CCMATHAYMGGGATRCCAAG			
<b>qnrBcf-F</b>	GTTRGCGAAAAAATTRACAG	<i>qnrBcF</i>	626	(103)
<b>qnrBIF-R</b>	CCMATHAYMGGGATRCCAAG			
<b>qepA-F</b>	ACATCTACGGCTTCTTCGTCG	<i>qepA</i>	501	(103)
<b>qepA-R</b>	AACTGCTTGAGCCCGTAGATC			
<b>aac(6')Ib-F</b>	CGATCTCATATCGTCGAGTGTT	<i>acc(6')Ib</i>	447	(106)
<b>aac(6')Ib-R</b>	TTAGGCATCACTGCGTGTTTC			
<b>oqxA-F</b>	CTCGGCGCGATGATGCT	<i>oqxA</i>	393	(107)
<b>oqxA-R</b>	CCACTCTTCACGGGAGACGA			
<b>oqxB-F</b>	TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC	<i>oqxB</i>	513	(107)
<b>oqxB-R</b>	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA			

## Electroforesis en geles de agarosa

Los productos amplificados en las reacciones de PCR con *primers* específicos y así como los correspondientes productos de las reacciones de PCR-multiplex fueron resueltos a 6V/cm en geles de agarosa al 1,5 % en *buffer* TAE 1X. Como colorante se utilizó bromuro de etidio 0,5 µg/ml y se emplearon marcadores de peso molecular, tales como Ladder 50 bp y 100 bp (Inbio Highway) y Ladder 1 kbp plus (PB-L Productos Bio-Lógicos).

Los geles fueron visualizados con el transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad.

## Secuenciación automatizada de ADN

Todas las secuencias nucleotídicas fueron analizadas según el método de Sanger. Esta metodología se basa en la síntesis de la cadena complementaria al molde de ADN, adicionando los correspondientes *deoxi-nucleótidos* (dNTPs), y análogos que no poseen el grupo 3'-OH, *dideoxi-nucleótidos* (ddNTPS), a partir de *primers* los cuales pueden ser universales y que hibridan con las secuencias flanqueantes del *poli-linker* de los vectores, o los mismos *primers* utilizados para las amplificaciones por PCR.

Las secuenciaciones se realizaron en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Argentina), o en la empresa Macrogen (Corea).

### Determinación de Grupos filogenéticos

Los grupos filogenéticos se determinaron mediante *PCR multiplex* en aquellos aislamientos pertenecientes a *E. coli* de aves, siguiendo el esquema planteado por *Clermont et al (108)* (Tabla 7). Este esquema se basa en la detección de tres genes diferentes: *chuA*, *yjaA* y *tspE4R*.

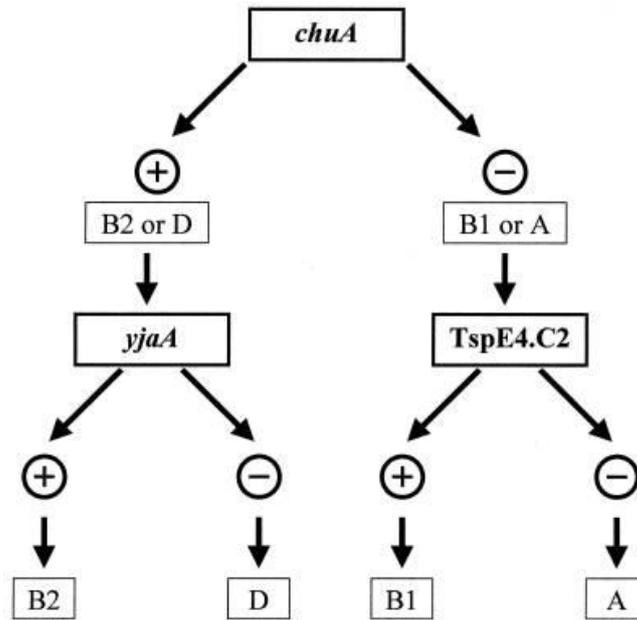
**Tabla 7:** *Primers* empleados para determinar grupo filogenético

<i>Primers</i>	Secuencia (5'-3')	Gen target	Producto (bp)	Referencias
<b>ChuA-F</b>	GACGAAACCAACGGTCAGGAT	<i>chuA</i>	279	<i>(108)</i>
<b>ChuA-R</b>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<b>YjaA-F</b>	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	<i>yjaA</i>	211	
<b>YjaA-R</b>	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
<b>TspE4R-F</b>	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	<i>TspE4R</i>	152	
<b>TspE4R-R</b>	CGCGCCAACAAAGTATTACG			

Los amplicones obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa al 1,5% en *Buffer TAE 1X*, teñidos y analizados según el patrón de bandas que presentaron.

### Interpretación

La interpretación se realizó en base a la presencia, ausencia y combinación de los productos de PCR de los tres genes analizados, determinando así el grupo filogenético según árbol dicotómico de *Clermont y col., (108)* (Figura 11).



**Figura 11:** Árbol dicotómico para determinar el grupo filogenético en *E. coli*.

### Tipificación molecular de los aislamientos productores de pAmpC y bla<sub>CTX-M</sub> por técnicas basadas en PCR: REP-PCR y ERIC-PCR

En aquellos aislamientos productores de pAmpC y bla<sub>CTX-M</sub> se realizó la tipificación molecular de los mismos a través de ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR* o *secuencias repetitivas consenso intragénicas*) y REP-PCR (*repetitive element palindromic PCR* o *secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas*) (109), con el objetivo de determinar la relación clonal entre dichos aislamientos (Tabla 8).

Estas técnicas de tipificación basadas en PCR, utilizan *primers* diseñados en base a secuencias repetitivas en el cromosoma. Estas secuencias están presentes en diferentes localizaciones a lo largo del cromosoma bacteriano. Cuando dos de estas secuencias están situadas lo suficientemente cerca, el fragmento de ADN que hay entre ambas es amplificado. Dado que el número y la localización de estas secuencias repetitivas es variable entre aislamientos, el número y el tamaño de los fragmentos resultante también lo resultan, por lo que se obtiene un patrón de

bandas característico para cada aislamiento, de un modo similar a los patrones obtenidos por electroforesis de campo pulsado (PFGE).

**Tabla 8:** *Primers* empleados para la reacción de REP/ERIC-PCR

<i>Primers</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Gen target</i>	<i>Producto (bp)</i>	<i>Referencias</i>
<b>ERIC-1</b>	CAC TTA GGG GTC CTC AAT GTA	PCR Tipificación	-	(109)
<b>ERIC-2</b>	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G			
<b>REP-1</b>	III GCG CCG ICA TCA GGC			
<b>REP-2</b>	ACG TCT TAT CAG GCC TAC			

Los productos obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa 1,5 % en buffer TBE 0,5 X (TRIS base 0.89 M, Borato 0.089 M, EDTA disódico 2.5 mM, para TBE 10X a pH 8) a 4,6 voltios/cm, durante 3 horas, revelado posteriormente en bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Las bandas resultantes se observaron con el transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad.

### Determinación de la localización plasmídica de β-lactamasas tipo pAmpC y BLEE: ensayos de transferencia de genes

Se realizaron experimentos de conjugación bacteriana, tanto en medio líquido como en medio sólido, donde se evaluó la capacidad de transferencia de los plásmidos portadores de pAmpC y *bla*<sub>CTX-M</sub>.

Según los perfiles de sensibilidad de las cepas dadoras se utilizaron las siguientes cepas como receptoras:

- ***E. coli* CAG12177:** F<sup>-</sup>, λ<sup>-</sup>, *zej-298:* Tn10 (Tet<sup>R</sup>), *gyrA261* (Nal<sup>R</sup>), *rph-1*. (M. Berlyn, *E. coli* Genetic Stock Center).
- ***E. coli* J53:** F<sup>-</sup>, (Azida Sódica<sup>R</sup>).
- ***Salmonella* M1744:** F<sup>-</sup> (Malbrán)
- ***E. coli* DH5α:** F<sup>-</sup>, 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) poa supE44 -thi-1 *gyrA96* relA1)
- ***E. coli* XL1-Blue:** endA1 *gyrA96*(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>).

### **Conjugación en medio sólido**

Se incubaron cultivos puros de las cepas dadoras y de la cepa receptora por separado en 5 ml de caldo TSB a 37°C con agitación durante 18 horas. El cultivo de la cepa dadora se diluyó 1/20 en TSB y se incubó nuevamente durante 3 horas con agitación, para obtener un cultivo en fase logarítmica. En una placa conteniendo agar tripteina de soja (TSA) se colocó una membrana de acetato de celulosa estéril (tamaño de poro de 0,2-0,45  $\mu\text{m}$ ). Sobre la membrana se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de células dadoras y receptoras, se incubó la placa a 37°C durante 3 y 24 horas. Posteriormente, las células fueron resuspendidas, transfiriendo las membranas a tubos plásticos de 15 ml los cuales contenían 3 ml de solución fisiológica estéril. Las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó tanto el sobrenadante como la membrana, y el pellet se sembró por extensión en placas de TSA suplementado con el antibiótico adecuado; lo mismo se realizó para los controles en medios de selección adecuados para las correspondientes cepas dadoras y las receptoras, pero sin presión de selección. Se incubó nuevamente a 37°C durante 24 horas.

### **Conjugación en medio Líquido**

Se incubaron cultivos puros de las cepas dadoras y de la cepa receptora por separado en caldo TSB con el antibiótico adecuado, a 37°C con agitación ON. El cultivo de la cepa dadora se diluyó (1/20 en TSB) y se incubó durante 3 horas con agitación hasta obtener un cultivo en fase logarítmica. Se mezclaron ambas cepas en una proporción 1:10 (dadora: receptora) en tubos de ensayo estériles y se incubaron durante 16 horas sin agitación. Para seleccionar los transconjugantes, se transfirió 1 ml del cultivo a un tubo eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos en microcentrífuga, luego el pellet se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de TSB y se sembró por extensión en placas de TSA suplementado con los antibióticos de selección adecuados.

### **Transformación por Electroporación**

Para los ensayos de transformación, se utilizó como cepa receptora *E. coli* DH5 $\alpha$  (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, Md)(Anexo). En este ensayo se utilizó el electroporador GenePulser (Bio-Rad, Watford, United Kingdom). Los plásmidos fueron previamente desalados, como se indicó en el Anexo.

Tanto las células electrocompetentes como los plásmidos desalados fueron descongelados y se mantuvieron sobre hielo, hasta el momento de uso. Se incorporó de 2 a 5  $\mu$ l del plásmido de interés sobre las células competentes y se transfirió la mezcla a la cubeta de electroporación previamente refrigerada. Se aplicó un pulso eléctrico programado de 2.5 kV, 25 $\mu$ F y 400 $\Omega$ . Luego, se resuspendieron las células con 1 ml de caldo 2XYT, y se transfirió la mezcla a un tubo estéril. Se incubó a 37°C durante 1-1,5 horas y se sembró 100  $\mu$ l del cultivo en placa de TSA suplementadas con el antibiótico adecuado. Se sembraron las células competentes en medio sin antibiótico y en medios de selección, como control de calidad del proceso. Se incubó durante 24 horas.

### **Análisis de los transformantes obtenidos**

Las colonias transformantes conteniendo los plásmidos de interés fueron analizadas, se observó si las colonias desarrolladas poseían las características fenotípicas deseadas, como resistencia a los antibióticos utilizados para la selección. Los clones fueron repicados en placas de LBA y luego se tomó una colonia y se suspendió en un volumen de 5 ml de caldo LB, conteniendo el antibiótico adecuado para ejercer presión selectiva y así evitar la pérdida del plásmido. Se incubaron durante 18 horas a 37°C con agitación. Se extrajeron los plásmidos o directamente se lo utilizó como templado para reacciones de PCR, para verificar la presencia del gen responsable de la resistencia obtenida. Los clones identificados como portadores del plásmido de interés se conservaron en caldo BHI con 20% de glicerol a -20°C.

### **Determinación del tamaño molecular de los plásmidos portadores de determinantes de resistencia**

Se determinó el tamaño molecular de los plásmidos de interés mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE). Se prepararon moldes de agarosa (*plugs*) conteniendo ADN total de las cepas dadoras y sus respectivos transconjugantes y/o electroporantes, tal como se describe en el Anexo. Luego, cada *plugs* fueron incubados a 37°C durante 30 minutos con el buffer adecuado para la enzima, y posteriormente se digirieron empleando 1U de la enzima S1 Nucleasa, por 3 horas a 37°C. La nucleasa S1 convierte plásmidos superenrollados en moléculas completamente lineales que pueden migrar como bandas discretas y que luego ser observadas luego de la tinción con bromuro de etidio (110); el ADN genómico no es digerido. Después de este proceso, las muestras se sometieron a electroforesis de campo pulsado en gel de agarosa al 1,2 % preparado en buffer TBE 0,5X, durante 20 horas a 6 voltios/cm a 14°C; con un pulso inicial de 5 segundos y uno final de 60 segundos, utilizando el equipo CHEF-DRII (*Bio-Rad*). Como marcador de peso molecular se utilizó *Lambda Ladder PFGE Marker* (Promega). El gel se tiñó con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y se visualizó en el transiluminador UV. Los reactivos empleados se describen en el Anexo.

### **Procedimiento de PFGE para *Salmonella* spp.**

#### ***Según protocolo empleando por Malbrán.***

Día 1:

Estriar en una placa de TSA, una colonia aislada de los cultivos a ensayar, para obtener un crecimiento confluyente. Incubar a 37°C por 14-18 horas.

Día 2:

Preparación de bloques de agarosa (Plugs):

1. Calentar el agarosa al 1% en el microondas a potencia media-baja y mantener en baño termostático a 55-60°C hasta que esté listo para usarse.
2. Dispensar en tubos de centrifuga de 1,5 ml, 1 ml de Buffer Tris 100mM: EDTA 100 mM para la suspensión bacteriana. Utilizar hisopos estériles humedecidos en el buffer estéril para levantar parte del crecimiento de la

placa de agar: suspender las células en el buffer girado el hisopo suavemente.

3. Ajustar la concentración de las suspensiones celulares, midiendo la OD en espectrofotómetro a 610 nm de longitud de onda y hasta llegar a una densidad óptica de 1.
4. Transferir 200  $\mu$ l de las suspensiones celulares ajustadas a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml rotulados. Si las suspensiones celulares están a temperatura ambiente, agregar el agarosa directamente; pero si están frías, incubar en baño termostatzado o estufa a 37°C por unos minutos.
5. Adicionar 10  $\mu$ l de proteinasa K (stock de 20 mg/ml) a cada tubo y mezclar suavemente por pipeteo.
6. Adicionar 200  $\mu$ l de agarosa 1% fundida, a los 200  $\mu$ l de suspensión celular. Mezclar pipeteando evitando de que se formen burbujas de aire en la mezcla. Dispensar la mezcla en los pocillos del molde para *plugs*. Dejar solidificar a temperatura ambiente por 10-15 min o pueden colocarse en la heladera (4°C) por 5min.

Lisis de las células en los *plugs* de agarosa:

7. Calcular la cantidad requerida de Proteinasa K/Buffer de lisis celular: para cada tubo de 50 ml de polipropileno adicionar 5 ml de buffer de Lisis y 25  $\mu$ l de una solución de Proteinasa K (20 mg/ml). Calcular la cantidad necesaria a preparar para la cantidad de aislamientos bajo estudio.
8. Colocar los *plugs* en los tubos de 50 ml con el buffer de lisis y Proteinasa K.
9. Incubar en baño termostatzado a 55°C por 1,5-2 horas con agitación vigorosa y constante (175-200 rpm). Alternativamente, la lisis puede realizarse durante 18 horas (overnight) en las mismas condiciones.

Día 3:

Lavado de los *plugs* de agarosa después de la lisis celular

10. Retira los tubos del baño termostatzado y descartar cuidadosamente el buffer de lisis.

11. Agregar al menos 10 ml de agua estéril calidad biología molecular pre-calentada a 54°C por 10-15 min. Descartar el agua y repetir el lavado con agua.
12. Pre-calentar buffer TE (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8.0) en baño de agua a 54°C para lavar los *plugs*.
13. Descartar el agua y añadir 10-15 ml de buffer TE estéril y agitar los tubos vigorosamente en baño termostatzado por 10-15 min. Descartar el buffer y repetir el paso de lavado tres veces más.
14. Transferir los *plugs* a microtubos con 2 ml de buffer TE 1X estéril. Continuar con la digestión del ADN o mantener a 4°C hasta su uso.

#### Digestión del ADN en *plugs* de agarosa con la enzima *XbaI*

15. Rotular los tubos para microcentrífuga de 1.5 ml con los números de los cultivos, agregar 4 tubos más para los controles de *Salmonella* serovar Braenderup H9812 (si se realiza un gel de 15 calles). Adicionar 200 µl de buffer 10X de la enzima (dilución 1:10) en cada tubo.
16. Remover cuidadosamente los *plugs* del buffer TE con una espátula y colocarlos en una placa estéril.
17. Cortar una porción de 2-2.5 mm de espesor del *plugs* con un bisturí y transferir la porción al tubo conteniendo el buffer.
18. Incubar en baño termostatzado a 37°C por 5-10 min o a temperatura ambiente por 10-15 min. Luego de la incubación remover el buffer completamente con una micropipeta asegurándose de no dañar el *plugs*.
19. Digestión enzimática: realizar una dilución 1:10 del buffer 10X con agua calidad biología molecular y adicionar la enzima de restricción *XbaI* (50U/ muestra para la digestión en dos horas o 30 U/ muestra para la digestión durante 18 hs).
20. Adicionar 200 µl de la mezcla de la enzima de restricción a cada tubo. Asegurase que los *plugs* estén sumergidos en la mezcla de reacción.
21. Incubar en baño termostatzado a 37°C por 18 horas.

Día 4:

Preparación del gel de agarosa (con colocación de previa de los *plugs* sobre el peine)

22. Prepara el volumen necesario de buffer Tris-Borato EDTA (TBE) 0.5X que se requiere para el gel (150 ml gel grande y 100 ml para un gel pequeño) y para la electroforesis (2200 ml).
23. Preparar agarosa seakem gold (SKG) al 1% en TBE 0.5X de la siguiente manera:
  - Pesar la agarosa en un frasco o Erlenmeyer de 500 ml con tapa de rosca.
  - Adicionar el buffer TBE 0.5X; agitar suavemente para dispersar la agarosa.
  - Fundir la agarosa en el horno de microondas por 60 seg; mezclar suavemente y repetir por intervalos de 15 seg, hasta que el agarosa esté completamente disuelta.
  - Colocar en un baño termostatzado a 50-60°C.
24. Luego de la digestión, retirar los tubos del baño termostatzado. Eliminar la mezcla enzima/buffer y adicionar 200 µl de TBE 0.5X. incubar a temperatura ambiente 5 min.
25. Retira los *plugs* de los tubos, colocar el peine sobre la mesada con la cara de siembra hacia arriba y ubicar los *plugs* en la superficie inferior de los dientes del peine como se indica abajo:
  - Colocar el *plug* de la cepa patrón *S. Braenderup* H9812 en las calles 1, 5, 10, 15.
  - Colocar las muestras en los pocillos remanentes.
26. Dejar que los *plugs* se sequen con el aire sobre el peine por 5 min o sellar sobre el peine con agarosa. Colocar el peine en el molde del gel. Asegurar que el molde para preparar el gel se encuentre nivelado.
27. Verter cuidadosamente la agarosa (enfriada a 55-60°C) en el molde.
28. Colocar dentro de la cámara de electroforesis el marco negro para el gel. Agregar de 2 a 2.2 l de TBE 0.5X recién preparado. Cerrar la unidad.
29. Encender el módulo de enfriamiento (14°C), la fuente de poder y la bomba (fijar en 70 para un flujo de 1 l/min).

30. Retirar el peine del gel después de que solidifique (30-45 min). Desembalar y sacar las barras laterales del molde para geles; retirar el exceso de agarosa de los lados y de la parte inferior de la plataforma. Mantener el gel en la plataforma y colocar cuidadosamente el gel dentro del marco negro en la cámara de electroforesis. Cerrar la cámara.

Seleccionar las siguientes condiciones en el equipo CHEFF DR II o III:

- Tiempo de pulso inicial a: 2.2 seg
- Tiempo de pulso final a: 63.8 seg
- Voltaje: 200 V (6 Volts/cm)
- Tiempo de corrida: 20-22 h (DR II); 17-20 h (DR III)

Día 5:

Tinción y documentación del gel de agarosa para PFGE

31. Cuando la corrida electroforética termina, apagar el equipo; retirar y teñir el gel con Gel RED (biotium-10000X) diluyendo 80 µl de la solución concentrada en 400 ml de agua destilada con 3,4 g de NaCl. Se tiñe entre 20-40 minutos en agitación.

32. Capturar la imagen en el Gel Doc 100. Guardar la imagen en formato .tiff no comprimido, para analizar luego con el programa BioNumerics.

## Tipificación molecular de plásmidos

La tipificación molecular de los plásmidos portadores de los diferentes determinantes de resistencia analizados en este trabajo de tesis, se llevó a cabo por medio de la identificación del grupo de incompatibilidad de los mismos, a partir de la técnica propuesta por Carattoli *y col*, como *PCR-Based Replicon Typing method* (PBRT) (84).

La identificación de los grupos de incompatibilidad: **IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncHI2, IncI 1, IncL/M, IncN, IncP, IncW, IncT, IncA/C, IncK, IncB/O, IncX, IncY, IncF, IncFIIA**, se realizó empleando cinco ensayos de PCR *multiplex* y tres PCR simples

(Tabla 9); estos representan los principales grupos de incompatibilidad circulantes en la familia *Enterobacteriaceae*.

En todos los casos se utilizó templado obtenido mediante lisis o ADN plasmídico, tanto del transformante y/o transconjugante obtenido.

**Tabla 9:** *Primers* empleados para determinación de los grupos de incompatibilidad

<i>Primers</i>	Secuencia (5´-3´)	productor bp/ Gen target	Uso	Referencias
<b>HI1 FW</b>	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471 pb (parA-parB)	Multiplex-1	
<b>HI1 RV</b>	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
<b>HI2 FW</b>	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	644 pb (iterions)		
<b>HI2 RV</b>	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
<b>I1 FW</b>	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139 pb (RNAI)		
<b>I1 RV</b>	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
<b>X FW</b>	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376 pb (oriY)		
<b>X RV</b>	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTAGC			
<b>L/M FW</b>	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	785 pb (repA, B, C)	Multiplex-2	
<b>L/M RV</b>	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
<b>N FW</b>	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559 pb (repA)		
<b>N RV</b>	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
<b>FIA FW</b>	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462 pb (iterions)		
<b>FIA RV</b>	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
<b>FIB FW</b>	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702 (repA)	Multiplex-3	
<b>FIB RV</b>	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
<b>W FW</b>	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242 pb (repA)		
<b>W RV</b>	GGTGCGCGGCATAGAACCGT			
<b>Y FW</b>	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765 pb (repA)		
<b>Y RV</b>	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			
<b>P FW</b>	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534 pb (iterions)	Multiplex-4	
<b>P RV</b>	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
<b>FIC FW</b>	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262 pb (repa2)		
<b>FIC RV</b>	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
<b>A/C FW</b>	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465 pb (repA)		(84)
<b>A/C RV</b>	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
<b>T FW</b>	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750 pb (repA)	Multiplex-5	
<b>T RV</b>	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
<b>FIIS FW</b>	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270 pb (repA)		
<b>FIIS RV</b>	CTCTGCCACAAACTTCAGC			
<b>FrepB FW</b>	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270 pb	PCR simples	
<b>FrepB RV</b>	GAAGATCAGTCACACCATCC			
<b>K/B FW</b>	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	K/B Fw con K RV: 160 bp	PCR simples	

<b>K RV</b>	TCTTTCACGAGCCGCGCCAAA	K/B Fw con
<b>B/O RV</b>	TCTGCGTTCCGCGCAAGTTCGA	B/O 159 bp

## Multilocus sequence Typing (MLST)

Esta técnica de MLST ha sido desarrollada y diseñada para identificar clones o líneas clonales en poblaciones bacterianas, por lo que se la considera un marcador molecular de aplicación en epidemiología global tanto a corto como a largo plazo. La determinación del secuenciotipos (ST) de *S. enterica*, se realizó mediante esta técnica de MLST.

### MLST de *Salmonella enterica*

El secuenciotipo (ST) de *S. enterica* se llevó a cabo usando el esquema desarrollado por Achtman y col (111). Este se basa en la amplificación por PCR y posterior secuenciación de los siguientes genes *housekeeping*:

- *thrA* (aspartokinase homoserine dehydrogenase),
- *purE* (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase),
- *sucA* (alpha ketoglutarate dehydrogenase),
- *hisD* (histidinol dehydrogenase),
- *aroC* (chorismate synthase),
- *hemD* (uroporphyrinogen III cosynthase)
- *dnaN* (DNA polymerase III beta subunit).

Se amplificó los fragmentos internos y luego se secuenció utilizando *primers* que hibridan dentro de la región amplificada. El perfil alélico y la determinación del ST fue llevado a cabo acordando según las recomendaciones de la Universidad de Warwick, Medical School (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>). La secuencia de los *primers* utilizados (Tabla 10) y las condiciones de amplificación optimizadas en este trabajo de tesis, se detallan a continuación:

**Tabla 10:** Condiciones y *primers* empleadas para determinar el secuenciotipo mediante MLST

<i>Primers</i>	Secuencia (5'-3')	productor bp/ Gen target	TA °C	Referencias
<b>thrA- F</b>	GTC ACG GTG ATC GAT CCG GT	852	49°C	(112)
<b>thrA- R</b>	CAC GAT ATT GAT ATT AGC CCG			
<b>purE-F1</b>	GAC ACCTCA AAA GCA GCGT	510	67 °C	
<b>purE-R2</b>	AGA CGG CGATAC CCA GCG G			
<b>sucA-F1</b>	CGC GCT CAA ACA GAC CTA C	643	48°C	
<b>sucA-R1</b>	GAC GTG GAA AAT CGG CGC C			
<b>hisD-F1</b>	GAA ACGTTC CAT TCC GCG C	804	67°C	
<b>hisD-R1</b>	GCG GAT TCC GGC GAC CAG			
<b>aroC-F</b>	CCT GGC ACCTCG CGCTAT AC	826	60.9 °C	
<b>aroC-R</b>	CCA CAC ACG GAT CGT GGC G			
<b>hemD-F1</b>	GAA GCGTTA GTG AGC CGT CTG CG	666	67 °C	
<b>hemD-R</b>	ATC AGC GAC CTT AAT ATC TTG CCA			
<b>dnaN-F</b>	ATG AAATTT ACC GTT GAA CGT GA	833	50 °C	
<b>dnaN-R</b>	AAT TTC TCA TTC GAG AGG ATT GC			
<b>dnaN-R1 Sec</b>	CCG CGG AAT TTC TCA TTC GAG	Solo para secuenciar		
<b>thrA- R1 Sec.</b>	GTG CGC ATA CCGTCG CCG AC			

## Caracterización del entorno genético de la $\beta$ -lactamasa tipo pAmpC

### Mapeo por PCR del entorno genético de $bla_{CMY}$

El entorno genético de  $bla_{CMY-2}$  se determinó mediante mapeo por PCR y secuenciación (113). Se emplearon dos sets de *primers* para amplificar las secuencias de inserción *ISEcp1* y *IS1294-ISEcp1*, que se describe a continuación: *ISEcp1-F* (GCATTCCTTCGAAATTCAGC) y *ISEcp1-R* (CAGCATTACCAGCTTTTCA) para *ISEcp1*; *IS1294-F* (ATGGATGGCCCAGAAGATAC) and *IS1294-R* (AGAGCGCAGCATAACGATTT) para *IS1294-ISEcp1*. Para la detección de la secuencia de inserción truncada corriente arriba de  $bla_{CMY-2}$  se llevó a cabo empleando: *ISEcp1CMY-F* (CTCTTCAGAATACAGACAGC) en combinación con el primer *ISEcp1CMY-R* (CCGATCCTAGCTCAAACAGC).

Los primers *Blc-F* (CATTCTGGTTGTCGCGTGT), *SugE-F* (AGCATGGCGATACTGACGAT), *SugE-R* (GCCTGATATGTCCTGGATCGT) y *EcnR-R* (GGATTGAGAGGGCAGAT) fueron usados como para amplificar los genes *blc-sugE-ecnR* corriente abajo de  $bla_{CMY-2}$  [12]. Los productos de PCR fueron

secuenciados usando Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), para confirmar las amplificaciones obtenidas.

### Factores de virulencia en *E. coli*

Se determinó mediante PCR los factores de virulencia presentes en los aislamientos de *E.coli* en bovinos. Se extrajo el ADN total mediante lisis. Los *primers* utilizados en las tres reacciones de *PCR multiplex* (Tabla 11).

**Tabla 11:** Primer empleados para determinación de los factores de virulencia

<i>Primers</i>	Secuencia (5´-3´)	Productor bp	Uso	Referencias
<b>CdtIII-F</b>	GAA AAT AAA TGG AAT ATA AAT GTC CG	558		
<b>CdtIII-R</b>	TTT GTG TCG GTG CAG CAG GGA AAA			
<b>CnflI-F</b>	TAT CAT ACG GCA GGA GGA AGC ACC	1243		
<b>CnflI-R</b>	GTC ACA ATA GAC AAT AAT TTT CCG			
<b>CdtIV-F</b>	CCT GAT GGT TCA GGA GGC TGG TTC	350	Multiplex M1	
<b>CdtIV-R</b>	TTG CTC CAG AAT CTA TAC CT			
<b>IucD-F</b>	AAA ACT GAC ATC GGA TGG C	253		
<b>IucD-R</b>	GTA TTT GTG GCA ACG CAG AA			
<b>Cnf1/2-F</b>	TTA TAT AGT CGT CAA GAT GGA	633		(114)
<b>Cnf1/2-R</b>	CAC TAA GCT TTA CAA TAT TGA			
<b>Sfa-F</b>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	420		
<b>Sfa-R</b>	CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A			
<b>Pap-F</b>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G	325	Multiplex M2	
<b>Pap-R</b>	ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A			
<b>Afa8-F</b>	CTA ACT TGC CAT GCT GTG ACA GTA	302		
<b>Afa8-R</b>	TA TCC CCT GCT TAG TTG TGA ATC			
<b>F17-F</b>	GCA GAA AAT TCA ATT TAT CCT TGG	531		
<b>F17-R</b>	CTG ATA AGC GAT GGT GTA ATT AAC			
<b>Stx1-F</b>	TTCGCTCTGCAATAGGTA	555		
<b>Stx1-R</b>	TTCCCAGTTC AATGTAAGAT			
<b>Stx2-F</b>	GTGCCTGTTACTGGGTTTTCTTC	118		
<b>Stx2-R</b>	AGGGGTCGATATCTCTGTCC			
<b>F5-F</b>	TATTATCTTAGGTGGTATGG	314	Multiplex M3	(115)
<b>F5-R</b>	GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTTC			
<b>F41-F</b>	GCATCAGCGGCAGTATCT	380		
<b>F41-R</b>	GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT			
<b>Eae-F</b>	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	425		
<b>Eae-R</b>	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA			
<b>Sta-F</b>	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTCTGTA	190		
<b>Sta-R</b>	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA			

## Caracterización sistemas Toxina-Antitoxina

Para la caracterización de los sistemas de toxina-antitoxina (TA), se realizaron PCR con diferentes *primers* específicos (Tabla 12). Se extrajo ADN total mediante lisis a los aislamientos de *S. enterica* y *E.coli* tanto a las cepas dadoras, como a las cepas transconjugantes y/o electroporantes obtenidas.

**Tabla 12:** *Primers* empleados para determinación del sistema TA

<i>Primers</i>	Secuencia (5'-3')	productor bp/Gen target	Uso	Referencias
<b>PemK-up</b>	AAC GAC AAT GGC TGG ATG C	232	TOXINA- ANTITOXINA	(116)
<b>PemK-low</b>	CCA ACG ACA CCG CAA AGC			
<b>CcdA-up</b>	AGG AAG GGA TGG CTG AGG T	230		
<b>CcdB-low</b>	GGT AAA GTT CAC GGG AGA C			
<b>RelE-up</b>	AAA AAC CCG ATG GCG ACA G	370		
<b>RelE-low</b>	TGA TAG ACC AGG CGA AAA C			
<b>ParD-up</b>	ACG GAC CAG CAG CAC CAG	534		
<b>ParE-low</b>	AGC CCT TGA GCC TGT CGG			
<b>VagC-up</b>	GGG ACC TGG ATT TTG ATG G	210		
<b>VagD-low</b>	GAC CAG ATG TTG GTG TCG			
<b>Hok-up</b>	AGA TAG CCC CGT AGT AAG TT	203		
<b>Sok-low</b>	GAT TTT CGT GTC AGA TAA GTG			
<b>PndC-up</b>	TCA ATC AAC CAG GGC TCT	140		
<b>PndA-low</b>	CCT CAC CAT CCA GAC AAA A			
<b>SrnB-up</b>	ACT GAT TGT AGC CTC TTC TTT	171		
<b>SrnC-low</b>	CAC CAC TGT ATT TCC CCT GT			

## Caracterización de *mcr-1* en aislamientos de *E.coli*

La detección del gen de codificación plasmídica *mcr-1*, se realizó mediante una reacción de PCR donde se amplificó un fragmento interno del gen, descrito por Liu y col. Para amplificar el fragmento completo de *mcr-1* y verificar los resultados obtenidos, se realizó otra PCR usando *primer* CLR5-F en combinación con MCR-1 (Tabla 13). Los amplicones obtenidos del tamaño esperado fueron purificados y posteriormente secuenciados. Las condiciones de reacción de cada una de las PCR, se detallan a continuación.

**Tabla 13:** *Primer* empleados para amplificar *mcr-1*

<b>Primers</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>productor bp/Gen target</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencias</b>
<b>CLR5-F</b>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	344	Fragmento <i>mcr-1</i> interno	(67)
<b>CLR5-R</b>	CTTGGTCGGTCTGTA GGG			
<b>CLR5-F</b>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	1575	<i>mcr-1</i> completo	
<b>MCR1-R</b>	TGCGGTCCTTTGACTTTGTC			

La concentración de los reactivos utilizados para la reacción de PCR para el fragmento interno de *mcr-1*, para un volumen total de 25 µl fue la siguiente: ADN 2,5 µl, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primers* 0,6 µM, dntp 0,2 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 4 U.

**Tabla 14:** Condiciones para la amplificación de *mcr-1* interno

<b>Condiciones de ciclado gen <i>mcr-1</i> interno</b>			
<b>Pasos</b>	<b>Temperaturas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>1</b>	94°C	4 min	1 ciclo
	94°C	30 seg	
<b>2</b>	52°C	30 seg	30 ciclos
	72°C	30 seg	
<b>3</b>	72°C	5 min	1 ciclo
<b>4</b>	16°C		

La concentración de los reactivos utilizados para la reacción de PCR para el fragmento completo de *mcr-1*, para un volumen total de 50 µl fue la siguiente: ADN 2,5 µl, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, *primers* 0,4 µM, dntp 0,3 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5 U.

**Tabla 15:** Mezcla de reacción y condiciones para la amplificación de *mcr-1* completo

<b>Condiciones de ciclado gen <i>mcr-1</i> completo</b>			
<b>Pasos</b>	<b>Temperaturas</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>1</b>	94°C	4 min	1 ciclo
	94°C	1 min	
<b>2</b>	52°C	1 min	30 ciclos
	72°C	1,30 min	
<b>3</b>	72°C	10 min	1 ciclo
<b>4</b>	16°C		

## Capítulo I:

### Consideraciones generales sobre *Salmonella enterica*

## Género *Salmonella*

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales*, clase  $\gamma$ -proteobacteria (117). Este género está constituido por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La especie *S. enterica* está compuesta por 6 subespecies: *S. enterica* subesp. *enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica* subesp. *arazonae*, *S. enterica* subesp. *diarizonae*, *S. enterica* subesp. *houtenae* y *S. enterica* subesp. *indica*. A su vez las subespecies *S. enterica* y la especie *S. bongori* se dividen en más de 2600 serovariedades, que están definidas en función de las asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H (118). La especie tipo es *Salmonella enterica*.

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente, pertenecen a la subespecie *S. enterica* (subespecie I) y por lo general la serovariedad lleva el nombre relacionado con el lugar geográfico donde se aisló por primera vez.

Dado que las serovariedades no tienen el nivel taxonómico de especie y por ello deben escribirse en letra tipo romano, no en itálica, de la siguiente manera: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium; o a fines prácticos: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium o *Salmonella* Typhimurium. Las serovariedades pertenecientes a las subespecies restantes y a *S. bongori*, de baja incidencia en patología humana y animal, se designan con el nombre de subespecie, seguido de la fórmula antigénica, por ejemplo: *Salmonella* subesp. IV 50: b: - (*Salmonella enterica* subesp. *houtenae* 50 : b: - ).

Los nombres de las serovariedades están condensados en el Esquema de Kauffmann- White - Le Minor (119), publicado por el centro colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella*, del Instituto Pasteur de París.

Se trata de bacilos Gram-negativos, de un tamaño que oscila entre 0.7x 2 y 1.5 x 5 micras, que se mueven por flagelos peritricos, a excepción de los serovariedades Gallinarum y Pollurum, variantes inmóviles. Son anaerobios facultativos, con un contenido de GC de 50-53%. No producen esporas. Entre sus características

bioquímicas se destaca que la mayoría puede utilizar citrato como fuente de carbono, produce gas como consecuencia de la fermentación de la glucosa (a excepción de algunos serotipos de *S. Typhi*), no fermenta la lactosa, y reduce el sulfato del medio produciendo ácido sulfúrico lo que confiere a sus colonias el color negro característico si se encuentra en el medio apropiado. Esta especie tolera altas concentraciones de sales biliares y su crecimiento no resulta inhibido por la presencia de colorantes químicos (verde brillante, selenito, etc.). Esta resistencia se emplea para el diseño de medios selectivos, en donde altas concentraciones de sales biliares y distintos colorantes adicionados, inhiben la flora acompañante permitiendo el crecimiento selectivo.

Este género producen la enzima catalasa y dan negativo en la prueba de la citocromo oxidasa. Reducen nitratos a nitritos. Son capaces de crecer en un rango de temperatura que varía desde los cinco a los 45-47°C, siendo la temperatura óptima de 35-37°C. El pH óptimo de crecimiento es de 6,5 -7,5; soportando un rango entre 4,5 -9. Se desarrollan bien a una actividad de agua ( $a_w$ ) de 0,945 a 0,999; aunque valores muy bajos, correspondientes a productos deshidratados, sobreviven largo tiempo. En los alimentos pueden multiplicarse hasta valores de  $a_w$  iguales a 0,930.

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos, salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales. Desde el punto de vista epidemiológico las salmonellas se pueden clasificar en tres grupos:

- ✓ Las que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de la salmonelosis.
- ✓ Las que infectan sólo al hombre: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *S. Paratyphi C*, que se transmiten en forma directa o indirecta de una persona a otra.
- ✓ Las que están adaptadas a especies animales: *S. Abortusovis*, en ovinos; *S. Abortusequi*, en equinos y *S. Gallinarum*, en aves.

Los miembros de estos géneros son los causantes de las siguientes patologías:

### *Salmonellosis*

Las bacterias del género *Salmonella* son la causa de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo. La salmonelosis es considerada una zoonosis, es decir, la transmisión del agente infeccioso es unidireccional, de los animales al ser humano, aunque algunos autores la consideran una infección bidireccional, en la cual, la especie humana y sus actividades estarían también implicadas en la transmisión de la enfermedad. No obstante su principal reservorio es el intestino de un gran número de animales, entre los que se destacan las aves de granja y otros animales estabulados, aunque hay autores que destacan la importancia de animales salvajes, fundamentalmente aves, en la diseminación de este microorganismo en el ambiente (120).

La infección se adquiere generalmente por el consumo de agua contaminada o alimentos de origen animal; carne mal cocinada, principalmente aves de corral, huevos y leche. Las heces humanas o de animales, también pueden contaminar la superficie de frutas y verduras, y pueden conducir a brotes de origen alimentario.

El animal más frecuentemente implicado son las aves de postura causando una infección asintomática, es decir la gallina adulta no muestra signos de la enfermedad. Los huevos se contaminan a su paso por el oviducto de gallinas infectadas. Normalmente es la cáscara la que está contaminada pero en ocasiones la contaminación se produce en el ovario y afecta también al interior del huevo (121). Las carnes de todos los animales de consumo pueden ser portadores de *Salmonella* (aves, bovinos, cerdos), la contaminación se pueden producir a partir del tubo digestivo durante el sacrificio en los mataderos aunque esta vía de infección es menos frecuente.

Su transmisión a menudo se produce por introducción de las bacterias en las zonas de preparación de los alimentos y la multiplicación en los mismos, debido a las inadecuadas temperaturas de almacenamiento, cocción inadecuada o la contaminación cruzada de productos listos para consumir. Por ello se asocian principalmente a procesos industriales de preparación de alimentos que resultan

no ser adecuados. Sin embargo también pueden transmitirse por contacto directo con los animales o humanos infectados o con materiales contaminados con heces. Las mascotas también pueden estar infectadas y transmitir la infección al entrar en contacto con ellas. Son especialmente portadores los reptiles (tortugas, lagartos, serpientes) y los pájaros.

La estacionalidad de la salmonelosis presenta un claro predominio en los meses de verano, motivado por el aumento en la temperatura ambiental que facilitaría la proliferación de la bacteria en los alimentos.

Cualquier persona puede infectarse con *Salmonella*, pero los grupos con mayor riesgo son los niños menores de 5 años, los adultos mayores de 65 años y las personas con sistemas inmunes debilitados, tales como las personas con HIV, diabetes, o que se someten a tratamiento por cáncer.

Desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60-80% de los casos son esporádicos. La enfermedad normalmente dura de 4 a 7 días, y la mayoría de las personas se recuperan sin tratamiento antibiótico. En algunos casos, la diarrea puede ser tan severa que la persona tiene que ser hospitalizada, incluso la infección puede propagarse del intestino al torrente sanguíneo, y luego a otras partes del cuerpo. En las infecciones extra-intestinales está recomendado que la persona reciba el tratamiento con antibióticos. Algunos serotipos de *Salmonella* son cada vez más resistentes a los antibióticos. Esta resistencia puede estar asociada con mayor riesgo de hospitalización, el desarrollo de una infección del torrente sanguíneo o el fracaso del tratamiento.

La mayoría de las personas infectadas con *Salmonella* desarrollan los signos y síntomas de 12 a 72 horas después de la exposición a la bacteria: diarrea, fiebre (casi siempre está presente) y calambres abdominales.

#### *Síndrome de fiebre entérica:*

Está asociado con *S. Typhi* (fiebre tifoidea), *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi C* y *S. Paratyphi B* (fiebre paratifoidea). Los tres primeros microorganismos son

patógenos exclusivos del hombre y *S. Paratyphi B* se puede encontrar también en animales.

La enfermedad es difícil de distinguir entre una variedad de enfermedades infecciosas. Si no se trata, puede provocar complicaciones intestinales y cerebrales, pudiendo provocar la muerte de hasta el 20% de los pacientes. En la Argentina los casos son muy raros. La infección, sin embargo, persiste en forma esporádica en sitios con grandes deficiencias sanitarias; se produce por el consumo de alimentos o agua contaminados con heces. El reservorio de la bacteria es el intestino del hombre. La persona una vez curada se puede convertir en portadora asintomática durante un tiempo.

En la Argentina, la notificación a Salud Pública es sólo obligatoria para estas tres serovariedades, no así para el resto de las *Salmonella* no typhi. En el Boletín Epidemiológico Nacional se reportaron entre 3 y 24 casos por 100.000 habitantes durante el 2010-2014. Las provincias de Salta, Corrientes y Formosa fueron las que reportaron más casos (121).

#### *Distribución de Salmonella en la Argentina*

Este trabajo de tesis se centra en el estudio de la resistencia de *Salmonella* no tifoidea (SNT), ya que estos son los principales patógenos causantes de diarrea transmitida por alimentos. La intoxicación alimentaria ocasionada por ésta bacteriana es una zoonosis y una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales en el hombre. En muchos países, la incidencia de infecciones ocasionadas por SNT ha aumentado notablemente en los últimos años, por razones que son poco claras.

Es importante remarcar que el género *Salmonella* no posee resistencia natural a ninguno de las familias de antimicrobianos ensayados en esta tesis y sobretodo hay que destacar que no posee  $\beta$ -lactamasas cromosómicas tipo AmpC (cefalosporinasas) ni BLEA.

Además, diversos estudios han reportado un aumento de la resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* spp. recuperadas de alimentos de origen animal. La resistencia en SNT, varía entre los diferentes serotipos. Durante la tarde década del 90 y principios del año 2000, surgieron varios clones de *Salmonella* multirresistentes, y desde entonces que se han expandido en todo el mundo.

En Argentina, en el año 2002, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) implementó un programa voluntario de control de salmonelosis de las aves, no solo de aquellas serovariedades que afectan específicamente a las aves, como *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*; sino también de otras serovariedades de salmonellas invasivas (móviles) como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Heidelberg*; estas especies preocupan en especial por su incidencia en la salud humana y porque las aves, son los principales vehículos de diseminación. Este programa tiene como objetivo, establecer las actividades de prevención y de vigilancia epidemiológica de esta bacteria en los sistemas de producción intensivos.

Debido a estos antecedentes y los descriptos en la Introducción de este trabajo de tesis, se destaca la importancia de estudiar *Salmonella* spp. recuperadas en diferentes animales de producción.

## Procedencia de los aislamientos

### Aislamientos bacterianos I: *Salmonellas* spp. recuperadas de bovinos y equinos

En una primera etapa, se analizaron 38 aislamientos de *S. enterica* de 10 serovariedades diferentes que habían sido previamente aisladas de bovinos y equinos enfermos entre los años 1998-2012. Dichos aislamientos pertenecen a la colección del Laboratorio de Bacteriología General del Instituto de Patobiología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

La identificación de los serotipos de *Salmonella* spp., se realizó mediante la técnica de aglutinación acordando el esquema de Kauffmann-White, utilizando antiseros producidos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos, ANLIS-Malbrán.

### Aislamientos bacterianos II: *Salmonella* spp. recuperadas de aves

En una segunda etapa y en colaboración con el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) se analizaron 69 aislamientos de *S. enterica*, pertenecientes a 19 serovariedades diferentes entre los años 2010-2012. Estos aislamientos fueron obtenidos de muestras medioambientales (cama de pollo) desde granjas de pollos parrilleros y desde muestras de material fecal de gallinas ponedoras.

Las granjas muestreadas forman parte de diferentes establecimientos productores de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos.

La toma de muestras fue realizada por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), como parte de un estudio de estimación de la prevalencia de *Salmonellas* spp. móviles en granjas de pollos de parrilleros y de gallinas ponedoras. Las pruebas bioquímicas fueron realizadas por APAC-DILAB-Senasa y la serotipificación de todos los aislamientos se realizó mediante la técnica de aglutinación acordando el esquema de Kauffmann-White, en el Instituto INEI-ANLIS (Malbrán) y en SENASA.

# Resultados

## Aislamientos bacterianos I

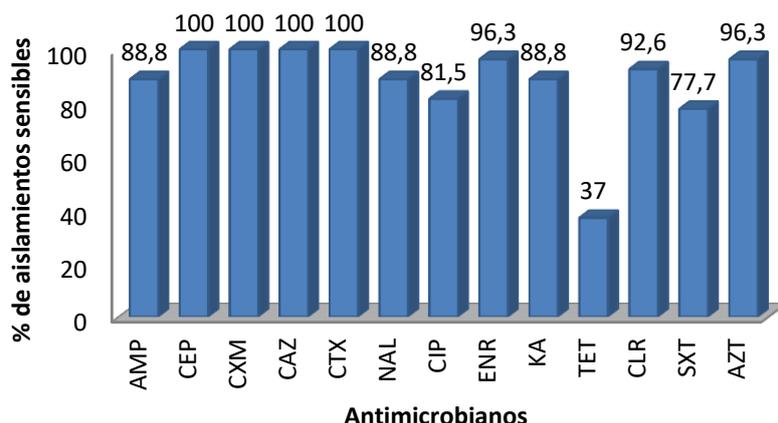
### Sensibilidad antibiótica

Se realizó un estudio transversal, analizando 38 aislamientos de *S. enterica* de 10 serovariedades diferentes. Este estudio se realizó con el fin de obtener datos de sobre la incidencia y así poder conocer la situación existente en estos aislamientos obtenidos de bovinos y equinos.

Al evaluar el perfil de sensibilidad a *Salmonella* spp. recuperados de bovinos (n=27), se observó un alto número de aislamientos sensibles a antibióticos  $\beta$ -lactámicos como AMP del 88,8% (24/27), CEP (100%), CXM (100%), CAZ (100%), CFT (100%) y AZT (96,3%). Dentro de las quinolonas también se observó sensibilidad a NAL del 88,8% (24/27), a CIP fue del 81,5% (22/27) y a ENR (96,3%); a KA se obtuvo un porcentaje sensibilidad de 88,8% (24/27) y a CLR de 92,7% (25/27). Se obtuvo un gran número de aislamientos sensibles a SXT del 77,7% (21/27) pero se destaca la baja proporción de aislamientos sensibles a TET, 37% (10/27) (Figura 12). Dos aislamientos del total analizado (2/27), mostraron resistencia a 4 o más familias de antimicrobianos con distinto mecanismo de acción.

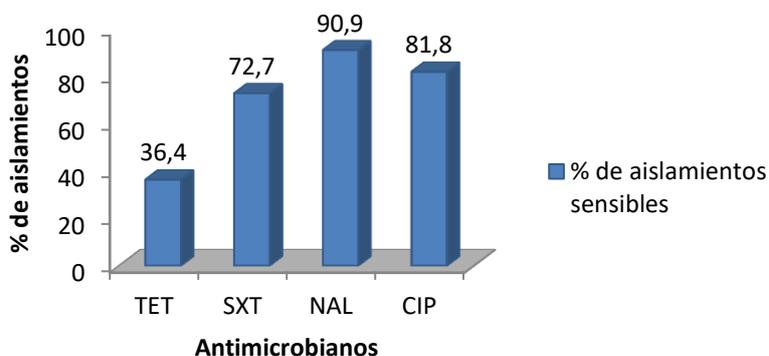
Ninguno de los aislamientos de bovinos mostró resistencia o sensibilidad disminuida a AMC, CTX, CRO, FEP, FOX, ni a los carbapenemes IMI y MER. Tampoco se observó resistencia a ENR, GEN, AMI y COL.

Cabe destacar que la serovariedad prevalente en estos aislamientos fue *S. Typhimurium* (16/27). Siendo las demás serovariedades *S. Dublin* (7/27), *S. Enteritidis* (1/27), *S. Mbandaka* (1/27), *S. Infantis* (1/27) y *S. Newport* (1/27).



**Figura 12:** Porcentaje de sensibilidad de los aislamientos recuperados bovinos en *Salmonella* spp. a los antimicrobianos ensayados. **AMP:** ampicilina, **CEP:** cefalotina, **CXM:** cefuroxima, **CAZ:** ceftazidima, **CTX:** cefotaxima, **NAL:** ác. nalidíxico, **CIP:** ciprofloxacina, **KA:** kanamicina, **TET:** tetraciclina, **CLR:** cloranfenicol, **SXT:** trimetoprima-sulfametoxazol, **ENR:** enrofloxacina y **AZT:** aztreonam.

Una situación muy parecida fue observada en el perfil de sensibilidad a antibióticos de *Salmonella* spp. de origen equino (n=11), donde de igual modo que en las muestras anteriores, se observó una baja proporción de sensibilidad a TET (4/11) y a SXT (8/11) (Figura 13). La sensibilidad disminuida a β-lactámicos fue muy baja; sin embargo un aislamiento de *S. Typhimurium* denominado 10/16, mostró resistencia a todas las oxiiimino-cefalosporinas ensayadas como CTX y CAZ, y también a FOX y CFT. Este aislamiento presentó una sensibilidad intermedia a NAL, CIP, TET y AZT; siendo totalmente sensible a los carbapenemes MEM, IMI, a los aminoglucósidos KA, GEN, AMI y a otros antibióticos como ST, CLR, SXT, ENR y a COL.



**Figura 13:** Porcentaje de sensibilidad a los antimicrobianos ensayados en los aislamientos obtenidos de equinos en *Salmonella* spp. **TET:** tetraciclina, **SXT:** trimetoprima-sulfametoxazol, **NAL:** ác. nalidíxico y **CIP:** ciprofloxacina.

### Análisis de $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G)

Un solo aislamiento de *Salmonella* spp. recuperada desde un equino (*S. Typhimurium* 10/16), mostró resistencia a las C3G. Por lo cual, en este aislamiento se ensayó la búsqueda de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC plasmídica o BLEE.

Se observó sinergia positiva en los ensayos de detección fenotípica de AmpC al emplear discos que contienen ácido borónico (BOR). En la Figura 14 se muestra el agrandamiento en el halo de inhibición de CTX y CAZ (efecto huevo) en la zona adyacente al disco conteniendo BOR, lo cual permite sospechar la posible producción de una cefalosporinasa tipo *AmpC*; el perfil de resistencia a  $\beta$ -lactámicos asociado a este aislamiento (R a FOX y S a FEP) condice con la producción de dicha enzima (Tabla 16).



**Figura 14:** Imagen del efecto sinérgico entre BOR (300  $\mu$ g) y las C3G, CTX (30  $\mu$ g) y CAZ (30  $\mu$ g), evidenciando la producción de enzima tipo AmpC.

**Tabla 16:** Detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasa en el aislamiento de *S. Typhimurium* 10/16, resistente a C3G

Aislamiento	FOX	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/CLAV	CAZ/CLAV	Aumento ≥ 5 mm	Efecto con BOR	B-lactamasa
<b>S. Typhimurium 10/16</b>	R	S	R	13	10	15	14	Ausente	POSITIVO CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC

### Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas

Se realizó una PCR-multiplex para detectar la presencia de genes *ampC*, que codifican para enzimas tipo ACC, CIT, DHA, EBC, FOX y MOX en el aislamiento de *S. Typhimurium* 10/16.

Se obtuvo un único amplicón de 462 bp, el cual sugirió la presencia del gen que codifica para el clúster de  $\beta$ -lactamasas CIT. Debido a que la reacción dio positiva para el fragmento interno CIT, se realizó posteriormente una PCR simple para obtener el gen completo *bla<sub>CMY</sub>*. Esta reacción dio como resultado, un amplicón de 1140 bp. El análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica obtenida corresponde con un 100% de identidad al gen *bla<sub>CMY-2</sub>*. Este resultado confirma que *S. Typhimurium* 10/16 posee una enzima tipo AmpCp, CMY-2 siendo ésta la responsable de la resistencia a las C3G observada.

### Evaluación de la transmisibilidad de los genes implicados en la resistencia a C3G

Con el objetivo de determinar si el gen *bla<sub>CMY-2</sub>* descrito en el aislamiento de *S. Typhimurium* 10/16, se encuentran asociados a elementos genéticos móviles, se llevaron a cabo en simultáneo, un ensayo de conjugación empleando como cepa receptora a *E. coli* CAG y ensayos de electroporación empleando *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Se logró eficientemente la transferencia plasmídica tanto mediante conjugación como por electroporación. Luego se analizaron y compararon las CIM entre las cepas dadora, las receptoras y la transconjugante (y electrotransformante); mostrando por ejemplo como la cepa transconjugante adquiere resistencia a AMP ( $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ), CTX (256  $\mu\text{g/ml}$ ), CAZ (64  $\mu\text{g/ml}$  y FOX (512  $\mu\text{g/ml}$ ). Como es de esperar para la cepa transconjugante (portando el gen *bla<sub>CMY-2</sub>*), la relación entre la

CIM obtenida de CTX, CAZ asociados al inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, CLA) no disminuye cuando se realiza la comparación con las CIM obtenidas con las cefalosporinas solas, tanto en la cepa dadora como en la cepa transconjugante (Tabla 17).

**Tabla 17:** Concentración inhibitoria mínima a diferentes antimicrobianos para la cepa silvestre (*S. Typhimurium* 10/16), la transconjugante (10-16 TC) y la electrotransformante (10-16 EP)

Aislamientos	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )										
	AMP	CTX	CAZ	FOX	CTX/CLA	CAZ/CLA	NAL	CIP	TET	KA	AMI
10-16	$\geq 256$	256	64	512	128	128	2	0.5	4	0.5	2
10-16 TC*	$\geq 256$	256	64	512	32	256	$\geq 64$	0.5	$\geq 32$	0.5	2
<i>E. coli</i> CAG 12177 <sup>a</sup>	2	1	1	1	0.5	1	$\geq 64$	0.016	$\geq 32$	0.25	0.25
10-16 EP**	$\geq 256$	32	64	512	16	256	$\geq 64$	0.5	1	0.5	2
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ <sup>b</sup>	2	1	1	1	1	1	$\geq 64$	0.06	1	0.5	0.5

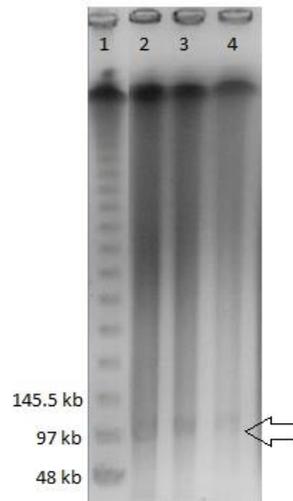
\*TC, transconjugante; \*\*EP, electrotransformante; <sup>a</sup> cepa receptora de la conjugación; <sup>b</sup> cepa receptora de la electrotransformación.

### Caracterización molecular del plásmido portador de *bla*<sub>CMY-2</sub>

La caracterización plasmídica por PBRT, permitió detectar la presencia de un único replicón perteneciente al grupo de incompatibilidad IncI1, tanto en la cepa dadora como en la transconjugante (TC) y en la electrotransformante (EP).

Mediante digestión con la enzima nucleasa S1 y posterior separación mediante electroforesis de campo pulsado, se comprobó la presencia de un solo plásmido tanto en el aislamiento de *S. Typhimurium* 10/16 como en los TC y EP (Figura 15).

El tamaño del plásmido fue estimado en aproximadamente 100 Kb, por comparación con el marcador Chef DNA size standard (Bio-Rad).

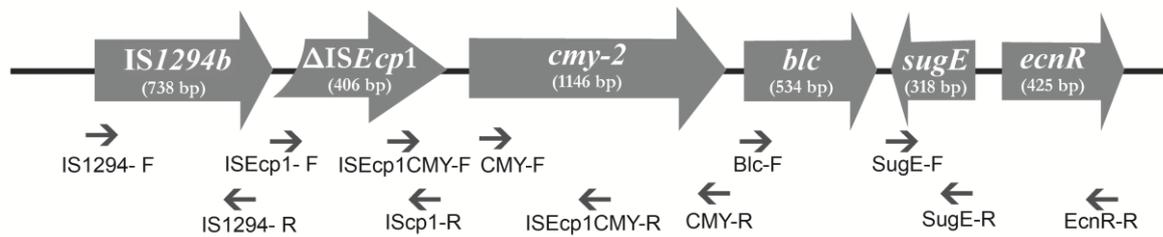


**Figura 15:** PFGE con nucleasa S1 de *S. Typhimurium* 10/16. **Calle 1:** marcador Chef DNA size standard (Bio-Rad), **calle 2:** *S. Typhimurium* 10-16 (dadora), **calle 3:** 10-16 EP, **calle 4:** 10-16 TC.

#### Entorno genético de *bla*<sub>CMY-2</sub>

La amplificación completa del gen *bla*<sub>CMY</sub> arrojó un amplicón de 1146 bp idéntico a *bla*<sub>CMY-2</sub>. Como demostramos en el apartado anterior, este gen está localizado en un plásmido de 100 Kb, que fue denominado pST10-16, el cual fue clasificado como parte del grupo de incompatibilidad IncI1. Posteriormente, se estudió el entorno genético de *bla*<sub>CMY-2</sub> mediante mapeo por PCR y posterior secuenciación.

Corriente arriba a *bla*<sub>CMY-2</sub> se identificó una secuencia de inserción truncada  $\Delta$ ISEcp1 y otra secuencia de inserción diferente pero completa denominada IS1294. Corriente abajo a *bla*<sub>CMY-2</sub> identificamos la presencia de los genes *blc* (que codifica una lipoproteína de la membrana externa), *sugE* (que codifica una proteína de resistencia a múltiples fármacos) y *ecnR* (codifica para una proteína reguladora transcripcional) (Figura 16).



**Figura 16:** Entorno genético de *bla*<sub>CMY-2</sub> en pST10-16. En la parte inferior de la figura, se muestran los *primers* utilizados para determinar el entorno de CMY-2. Los *primers* empleados en el mapeo y el sitio donde hibridan se marcan con flechas. Las secuencias de los mismos se detallan en materiales y métodos.

### Secuenciación del Plásmido pST10-16

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en la Unidad de Genómica y Bioinformática (UGB) del Instituto de Biotecnología (INTA) utilizando la plataforma Illumina MiSeq. Se obtuvieron 356.180 lecturas pareadas con una longitud promedio de 246 pb. Los extremos de las lecturas fueron recortados con Trimmomatic v0.33 (122) y las mismas fueron filtradas por calidad utilizando ALLPATHS-LG. Las lecturas pareadas remanentes fueron fusionadas en fragmentos con el software FLASH v1.2.11 (123).

Luego, se eliminaron las secuencias correspondientes a ADN cromosómico mediante el mapeo de las lecturas contra la secuencia genómica de la cepa electrotransformante a partir de la cual se purificó el plásmido (*E. coli* DH5 $\alpha$ , GenBank n° de acceso JRYMO1000004.1) utilizando el programa Bowtie v0.12.7 (124). Tras este paso se obtuvieron cerca de 80.000 lecturas pareadas remanentes, que representan secuencias no cromosómicas, las cuales fueron utilizadas como base para el posterior ensamblado del plásmido.

Se realizó un ensamblado *de novo* en dos pasos, primero con el ensamblador Celera v8.3 (125) y luego usando los *contigs* obtenidos como entrada para el ensamblador SPAdes v3.5 (126). Mediante este método se obtuvieron 44 *contigs* con una

longitud acumulada de 131.404 pb (N50 = 95.464 pb) y un contenido de GC promedio de 48.6%. Los pasos siguientes se llevaron a cabo utilizando únicamente el *contig* de mayor longitud, que cubre un 73% de la longitud total de secuencia obtenida.

La anotación funcional de la secuencia plasmídica se realizó utilizando el servidor RAST v2.0 (127). Se hallaron 134 marcos de lectura abiertos, de los cuales 51 corresponden a proteínas hipotéticas.

Al analizar la secuencia del plásmido pST10-16 se observa que está compuesto por dos grandes módulos que incluye diferentes regiones: 1- módulo *Core*- que incluye la región de ADN para la transferencia por conjugación (región *plasmid transfer*), para el ensamblaje del pilus de conjugación (*thin pilus assembly*), región encargada del mantenimiento (*plasmid maintance*) y modificación (*DNA modification*) del plásmido y 2- por un módulo que se puede considerar de genes accesorios, formado por genes de resistencias y elementos transponibles (Figura 17).

pST10-16 pertenece al grupo de incompatibilidad IncI1. Se investigó la presencia de los fragmentos internos de los siguientes genes *repl*, *ardA*, *trbA*, *sogS* y *pilL*, de acuerdo al esquema planteado para la determinación de pMLST de este grupo de incompatibilidad (128). Mediante ésta búsqueda se pudo determinar a qué secuenciotipo pertenece el plásmido pST10-16. La búsqueda de estos fragmentos internos en el genoma y el posterior ingreso de los mismos en la página ([http://pubmlst.org/perl/bigssdb/bigssdb.pl?db=pubmlst\\_plasmid\\_seqdef&page=sequenceQuery](http://pubmlst.org/perl/bigssdb/bigssdb.pl?db=pubmlst_plasmid_seqdef&page=sequenceQuery)), arrojó los siguientes alelos probables *repl: 1*, *ardA: 14*, *trbA: 3*, *sogS:4* y *pilL:1*. La combinatoria no resulto en un ST previamente definido. Los secuenciotipos probables teniendo en cuenta los *match* más cercanos son: ST4, ST12 (complejo clonal CC-12), ST22 Y ST144 (ver Tabla 18).

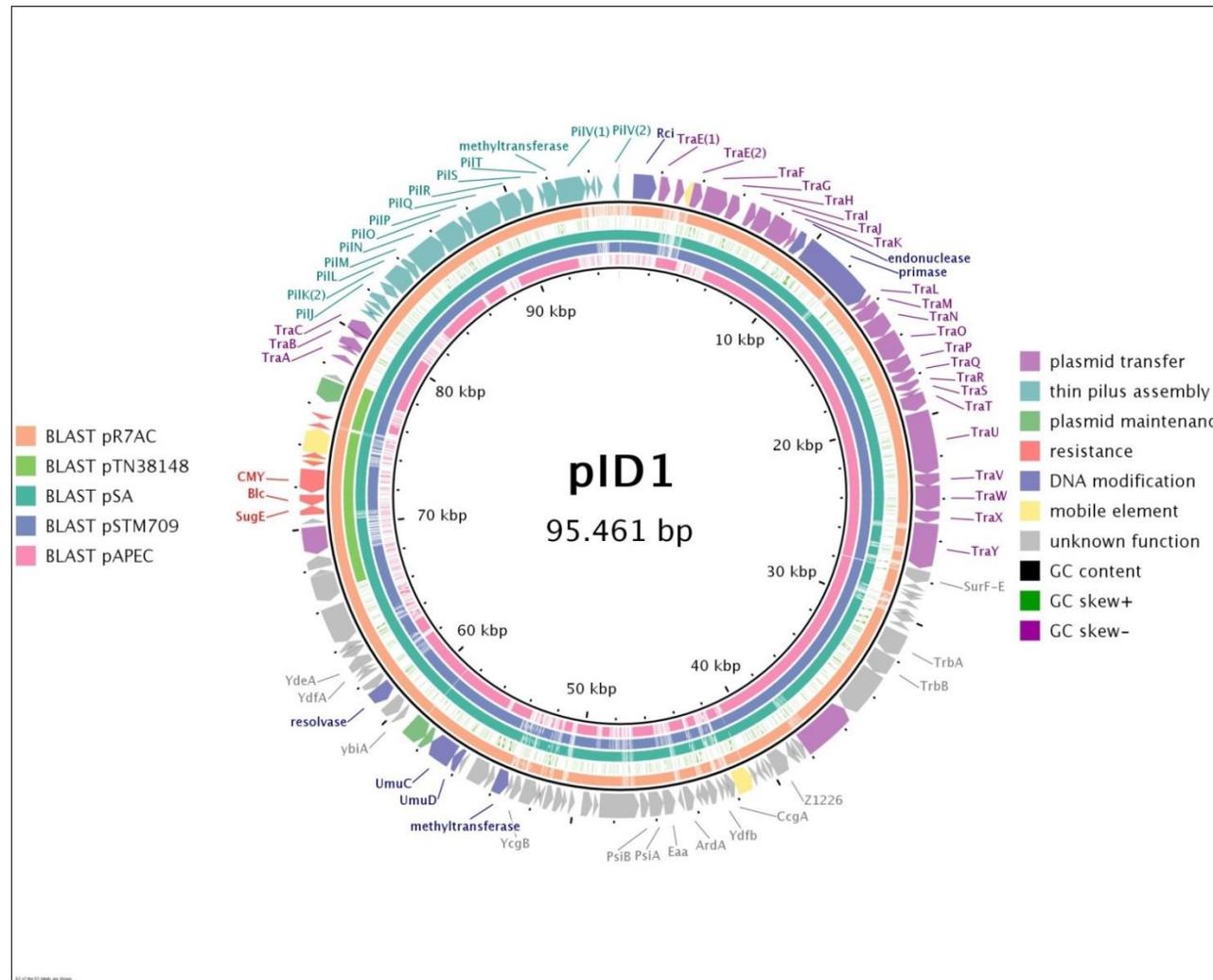
**Tabla 18:** Determinación pMLST en el pST10-16

ST	rep11	ardA	trbA	sogS	pilL	clonal complex
4	1	3	3	4	1	
12	1	4	3	4	1	CC-12
22	1	6	3	4	1	
147	1	14	3	2	1	
ST pST10-16	1	14	3	4	1	

En el mapa gráfico generado (Figura 18) se muestra la comparación con secuencias plasmídicas depositadas en la bse de datos del NCBI y el resultado obtenido al alinearlo contra el plásmido pST10-16. Se pudo notar que éste plásmido posee un 98% de similitud (99% de cobertura) con el plásmido pR7AC de *E. coli* (KF434766.1). Al compararlo con los plásmidos de *Salmonella* depositados en base de datos, se obtuvo un 99% de similitud (98% de cobertura) con el plásmido pSA de *S. Heidelberg* (CP016533.1), mientras que se obtuvo un elevado porcentaje de similitud (99%) pero un menor porcentaje de cobertura (86%) con el plásmido pSTM709 (NC-023915.1) de *S. Typhimurium*. En la comparación con éstos tres plásmidos, se observa una organización conservada de los segmentos que forman el *core* central formado por la región de conjugación, formación del *pilus* y modificación del ADN. Las principales diferencias se detectaron en regiones con funciones desconocidas o no predichas, y a su vez se observó diferencias menos marcadas en la región encargada de la formación del *pilus* sexual.

Por el contrario, cuando se realiza la comparación contra el plásmido pNT38148 de *E. coli* (FM246883) solo se observó un 99% de similitud con un 100% de cobertura del pNT38148 con el módulo correspondiente a los genes accesorios (región que incluye la  $\beta$ -lactamasa *bla*<sub>CMY-2</sub> y las secuencias de inserción). El plásmido pAPEC de *E. coli* (CP010317.1) fue totalmente diferente, como era de esperarse, dado que fue incluido ya que presenta gran similitud en la región del *core* pero no en la región accesoria. Esto permitió realizar la comparación con una región no homóloga a CMY-2.





**Figura 18:** gráfico donde se muestra resultado del alineamiento del plásmido pST10-16 con otros existentes en la base de datos del NCBI. Programa GC View Server (129). Las barras sólidas independientemente del color indican regiones idénticas.

### Determinación de mutaciones presentes en QRDR y caracterización de los determinantes PMQR

Los aislamientos recuperados de bovinos y equinos, que mostraron ser resistentes mediante los ensayos de difusión en agar o dilución en caldo a los antimicrobianos NAL y CIP (2/38), o resistentes a NAL e intermedias a CIP y/o ENR (2/38), fueron seleccionadas para analizar la presencia de mutaciones en la región QRDR de los genes *gyrA* y *parC* (Tabla 19).

En 3/4 aislamientos seleccionados, se encontró solo una mutación en *gyrA*, que representaron al intercambio de los codon Asp87 por Asn (D87N) en *S. Gallinarum* 06/390 (R a NAL Y CIP), Ser83 por Phe (S83F) en *S. Gallinarum* 10/27-6 (R a NAL Y CIP). *S. Enteritidis* 07/58-2, resistente a NAL pero intermedio a CIP, mostró un intercambio del codón Asp 87 por Gly (D87G). En el aislamiento *S. Typhimurium* 11/85-26 no se detectaron mutaciones en estas regiones. Ninguno de los aislamientos analizados presentó mutaciones en *parC*, considerado el sitio blanco secundario de las quinolonas en bacterias gram negativas.

**Tabla 19:** Análisis de la región QRDR y los genes PMQR en los aislamientos de *Salmonella* spp. resistentes a quinolonas

Aislamiento	Test de difusión			MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			Sustituciones aminoacídicas en:				PMQR
	CIP	NAL	ENR	CIP	NAL	ENR	<i>gyrA</i>		<i>parC</i>		
<i>S.</i> <i>Typhimurium</i> ST4/74 silvestre	S	S	S	.....	.....	.....	Ser 83	Asp 87	Ser 80	Glu 84	.....
<i>S. Gallinarum</i> 06/390	R	R	I	> 256	> 64	1	.....	Asn	.....	.....	.....
<i>S. Enteritidis</i> 07/58-2	I	R	I	0,25	> 64	0,25	.....	Gly	.....	.....	.....
<i>S. Gallinarum</i> 10/27-6	R	R	I	4	> 64	4	Phe	.....	.....	.....	.....
<i>S.</i> <i>Typhimurium</i> 11/85-26	I	R	S	0,5	128	1	.....	.....	.....	.....	qnrB- like

### **Determinantes PMQR**

La caracterización molecular de los determinantes PMQR se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*. Además de los genes *qnr*, se analizó la variante de la aminoglicósido acetiltransferasa (*aac (6')-Ib-cr*) y las bombas de eflujo *qepA* y *oqxAB*.

De todos los aislamientos de *Salmonella* spp. resistentes a NAL e intermedias a CIP, recuperadas de bovinos, sólo *S. Typhimurium* 11/085 presentó el amplicón del tamaño esperado (676 bp) para *qnrB*-like, cuya variante alélica fue caracterizada. El resto de los determinantes analizados fueron negativos (Tabla 19). La presencia de genes PMQR no confiere necesariamente resistencia completa a NAL y podrían solo conferir bajo nivel de resistencia a FQ.

## **Aislamientos bacterianos II**

### **Sensibilidad antibiótica**

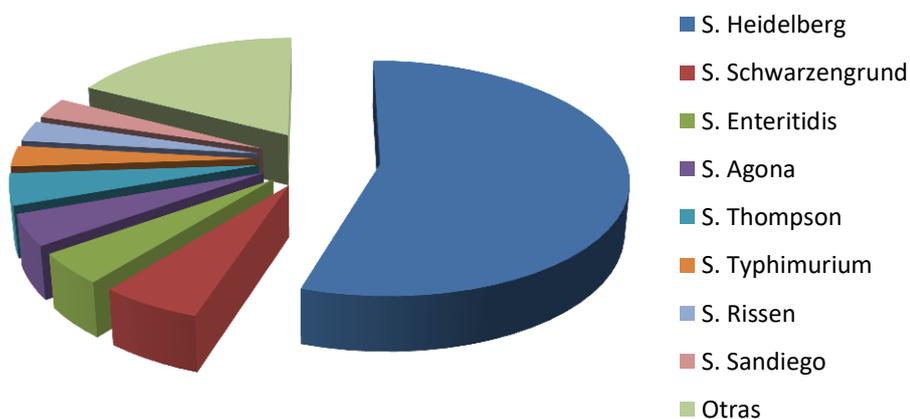
En este apartado del trabajo de tesis, se estudió el perfil de sensibilidad de 69 aislamientos de *Salmonella* spp. a diferentes clases de antimicrobianos no solo de importancia en medicina clínica sino también en medicina veterinaria. El perfil de sensibilidad a los antimicrobianos ensayados se describe en la Figura 15.

La serovariedad prevalente fue *S. Heidelberg* correspondiendo a un 55% (38/69) de los aislamientos analizados (Tabla 20). Las demás serovariedades encontradas tienen una proporción muy baja (entre 2,9% y 5,8%).

**Tabla 20:** Serovariedades de *S. enterica* aisladas de aves

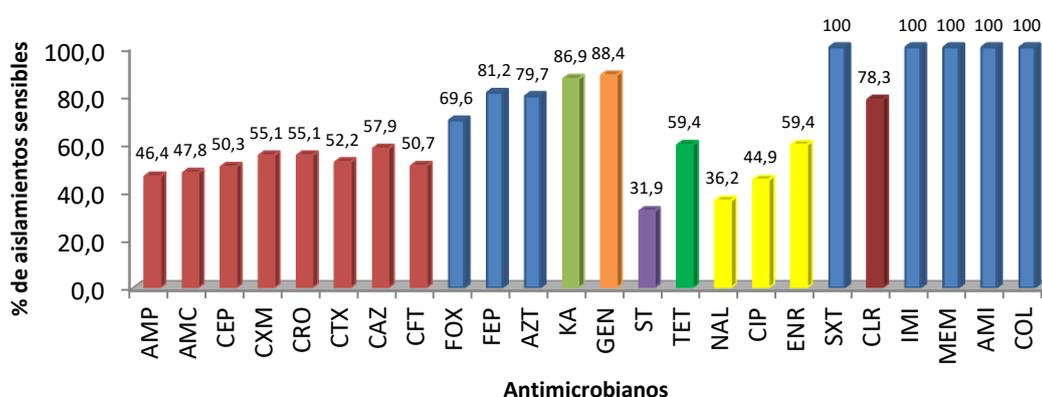
Serovariedades	N° de aislamientos
S. Heidelberg	38
S. Schwarzengrund	4
S. Enteritidis	3
S. Agona	3
S. Thompson	3
S. Typhimurium	2
S. Rissen	2
S. San Diego	2
S. Mbandaka	1
S. Oranienburg	1
S. Livingstone	1
S. Javiana	1
S. Havanna	1
S. Derby	1
S. Anatum	1
S. Senftenberg	1
S. Orion	1
S. Montevideo	1
S. Give	1
S. Cerro	1

#### Serovariedades de *S. enterica* aisladas de aves



Al contrario, de lo observado en los sistemas de producción bovino y equino del período 1998-2012, alrededor del 52% de los aislamientos aviáres presentaron sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos: AMP, AMC, CEP, CXM, CTX, CAZ, CRO. También se

observó un alto porcentaje de resistencia a FOX. Un 50,7% (35/69) de los aislamientos presentó sensibilidad a CFT, la C3G más usada en medicina veterinaria. En la mayoría de los aislamientos bajo estudio se observó un bajo porcentaje de sensibilidad a ST 31,9% (22/69). La sensibilidad a quinolonas fue muy baja: 36,2% (25/69) a NAL; 44,9% (31/69) a CIP y 59,4% (41/69) a ENR. La sensibilidad a CLR, fue de un 78,3% (54/69). Todos los aislamientos fueron sensibles al aminoglicósido AMI, a los carbapenemes IMI y MEM, a las sulfonamidas como SXT y a COL (Figura 19).



**Figura 19:** Porcentaje de sensibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos *Salmonella* spp. recuperados de aves. Antimicrobianos ensayados: **AMP:** ampicilina, **AMC:** amoxicilina-ác. clavulánico, **CEP:** cefalotina, **CXM:** cefuroxima, **CRO:** ceftriaxona, **CTX:** cefotaxima, **CAZ:** ceftazidima, **CFT:** ceftiofur, **FOX:** cefoxitina, **FEP:** cefepime, **AZT:** aztreonam, **KA:** kanamicina, **GEN:** gentamicina, **ST:** estreptomicina, **TET:** tetraciclina, **NAL:** ácido nalidíxico, **CIP:** ciprofloxacina, **ENR:** enrofloxacina, **SXT:** trimetoprima-sulfametoxazol, **CLR:** cloranfenicol, **IMI:** imipenem, **MEM:** meropenem, **AMI:** amicacina y **COL:** colistina

En la Tabla 21, se muestra las serovariedades y el patrón de resistencia calculado por medio del coeficiente de MARs (*Multiple Antibiotic Resistance*), detallado en Materiales y métodos.

**Tabla 21:** Perfiles de resistencia a antimicrobianos en los diferentes serovariedades de *Salmonella* spp. recuperadas de aves

Serovariedad (n°)	Perfil de antimicrobianos(24*)	Coficiente de MARs
<i>S. Typhimurium</i> n°1	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-AZT-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT	0,63
<i>S. Havanna</i> *	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT	0,58

S. Heidelberg n°28B* - n°32B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FEP-CRO-AZT-ST-TET-NAL-CIP-CFT	0,58
S. Heidelberg n°14B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-AZT-ST-NAL-CIP-ENR-CFT	0,58
S. Schwarzengrund (13B)*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-KA-ST-NAL-CIP-ENR-CFT	0,58
S. Heidelberg n°7B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-ST-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT	0,58
S. Heidelberg n°23B* -n°24B*	AMP-CEP-CXM-CTX-CAZ-FEP-CRO-AZT-ST-NAL-CIP-ENR-CFT	0,54
S. Heidelberg n°37B	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-FEP-CRO-ST-NAL-CIP-CFT	0,54
S. Heidelberg n°20B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-AZT-ST-NAL-CIP-CFT	0,54
S. Heidelberg n°4A* -n°11B* -n°12B*-n°19B	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-ST-NAL-CIP-ENR-CFT	0,54
S. Heidelberg n°4B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-KA-NAL-CIP-ENR-CFT	0,54
S. Agona n°8B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-AZT-NAL-CIP-CFT	0,5
S. Heidelberg n°2A*	AMP-AMC-CEP-CXM-CAZ-FEP-CRO-AZT-ST-TET-NAL-CFT	0,5
S. Heidelberg n°36B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FEP-CRO-AZT-ST-TET-CFT	0,5
S. Heidelberg n°10B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-NAL-CIP-ENR-CFT	0,5
S. Heidelberg n°3B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-NAL-CIP-CLR-CFT	0,5
S. Heidelberg n°7B-n°9B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-FEP-CRO-ST-NAL-CIP-ENR-CFT	0,5
S. Agona n°2B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-AZT-ST-CFT	0,46
S. Heidelberg n°33B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FEP-CRO-AZT-ST-CFT	0,46
S. Heidelberg n°6B	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-NAL-CIP-CFT	0,46
S. Heidelberg n°16B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-FEP-CRO-NAL-CIP-ENR-CFT	0,46
S. Heidelberg n°21B	AMP-AMC-CEP-CTX-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR	0,46
S. Heidelberg n°38B	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FEP-CRO-CLR-CFT	0,42
S. Heidelberg n°3A*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-CAZ-FOX-CRO-ST-CFT	0,42
S. Heidelberg n°10B*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-FEP-CRO-AZT-NAL-CFT	0,42
S. Oranienburg*	AMP-AMC-CEP-CXM-CTX-FOX-CRO-NAL-ENR-CFT	0,42
S. Heidelberg n°26B	AMP-AMC-CEP-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR	0,42
S. Heidelberg n°35B	AMC-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR	0,38
S. Heidelberg n°34B	AMC-FOX-KA-ST-NAL-CIP-ENR-CFT	0,33
S. Heidelberg n°26B	AMP-AMC-CEP-GEN-ST-NAL-CIP-ENR	0,33
S. Give	KA-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR	0,3
S. Heidelberg n°29B	KA-GEN-TET-NAL-CIP-ENR-CLR	0,3
S. Heidelberg n°25B	AMC-CTX-ST-TET-NAL-CIP-ENR	0,3
S. Heidelberg n°31B	AMP-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR	0,3
S. Schwarzengrund n°3	GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR	0,3
S. Heidelberg n°30B	AMP-AMC-CEP-ST-NAL-CIP	0,25
S. San Diego	ST-TET-NAL-CIP-ENR	0,2
S. Schwarzengrund n°1	KA-ST-TET-NAL-CIP	0,2
S. Anatum	ST-TET-NAL-CFT	0,17
S. Heidelberg n°5B	GEN-TET-CLR-CFT	0,17
S. Heidelberg n°1B	ST-NAL-CIP-ENR	0,17
S. Heidelberg n°22B	FOX-ST-NAL-CIP	0,17
S. Heidelberg n°27B y S. Montevideo	ST-TET-NAL-CIP	0,17
S. Schwarzengrund n°2- S. Heidelberg n°1A	ST-NAL-CIP-ENR	0,17

S. Thompson n°1	KA-ST-TET-NAL	<b>0,17</b>
S. Derby	ST- TET- CLR	<b>0,125</b>
S. Heidelberg n°18B	GEN-TET-CLR	<b>0,125</b>
S. Rissen n°1	NAL-ENR-CLR	<b>0,125</b>
S. Thompson n°2	KA-TET-ENR	<b>0,125</b>
S. Livingstone - S.Orion	TET-ST	<b>0,083</b>
S. Senftenberg	ST-CLR	<b>0,083</b>
S. Thompson n°3	ST-TET	<b>0,083</b>
S. Enteritidis n°1	TET	<b>0,042</b>
S. Enteritidis n°2	CAZ	<b>0,042</b>
S. Enteritidis n° 3	AMP	<b>0,042</b>
S. Mbandaka - S.Typhimurium n°1	ST	<b>0,042</b>
S. Agona		<b>0</b>
S. Cerro		<b>0</b>
S. Javiana		<b>0</b>
S. Rissen n°2		<b>0</b>

\*(24), n° de antimicrobianos probados.

Al analizar los perfiles de resistencia se observó que solo 4/69 (5,8%) de los aislamientos fueron sensibles a la totalidad de los antibióticos ensayados y es de destacar la variedad de serotipos que cumplen esta condición de sensibilidad. Entre los fenotipos más comunes, se encontraron los de resistencia a cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación y resistencia a fluoroquinolonas.

Un total de 56 aislamientos (81,2%) cumplieron la condición de fenotipo de multirresistencia (resistencia a tres o más familias de antimicrobianos), pertenecientes a aislamientos de diferentes serovariedades pero la mayoría dentro de *S. Heidelberg* (40/56 de aislamientos multirresistentes).

Se analizó la presencia de multirresistencia a tres o más familias de antimicrobianos y se observó que aquellos aislamientos que son resistentes a solo 3 familias, mostraron un índice de MARs de 0,125. A medida que aumenta la multirresistencia a más antimicrobianos este índice también se incrementó, hasta llegar a un valor máximo de 0,63 en aquellos aislamientos que fueron resistentes a 9 familias de diferentes antibióticos.

Se observó que los 23 aislamientos que mostraron un índice de MARs entre 0,5 y 0,63 (resistentes a 7 o más familias de antimicrobianos), 19 de ellos pertenecen a *S. Heidelberg*, mientras que el resto fueron de diferentes serovariedades (*S. Typhimurium*, *S. Havanna*, *S. Schwarzengrund* y *S. Agona*).

Todos los aislamientos obtenidos que presentaron resistencia a C3G y a fluoroquinolonas, fueron estudiados exhaustivamente y serán abordados en los siguientes apartados de esta tesis.

### **Análisis de $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G)**

De los 69 aislamientos analizados de *Salmonella* spp. el 53,6% (37/69) fueron resistentes a AMP y 46,4% (32/69) de los aislamientos fueron a su vez resistentes a C3G. En concordancia con las serovariedades, *S. Heidelberg* fue prevalente dentro de los aislamientos resistentes con (25/31).

A los 31 aislamientos de *Salmonella* spp. que mostraron resistencia a las C3G, se sometieron a ensayos para detectar la presencia de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC plasmídica o BLEE.

En 19/31 aislamientos bacterianos ensayados (61,3%) se observó sinergia positiva en los ensayos de detección fenotípica de AmpC empleando discos conteniendo ácido borónico (BOR). Los resultados se detallan en la Tabla 22.

**Tabla 22:** Detección de la presencia de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC en los aislamientos de *S. enterica* resistentes a C3G aisladas de aves

Aislamientos	FOX	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/ CLAV	CAZ/ CLAV	Aumento $\geq$ 5 mm	Efecto con BOR	$\beta$ -lactamasa
<b>S. Typhimurium N° 1</b>	R	S	R	18	14	18	18	Ausente	POSITIVO CTX/BOR	AmpC
<b>S. Oranienburg</b>	R	S	R	14	15	16	17	Ausente	POSITIVO CTX/BOR	AmpC
<b>S. Havanna</b>	R	S	R	14	13	17	17	Ausente	POSITIVO CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC

S. Heidelberg N° 3 A	R	S	R	18	17	18	19	Ausente	POSITIVO CTX/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 4 A	R	S	R	15	16	18	19	Ausente	POSITIVO,CTX/BOR	AmpC
S. Agona N° 2B	R	S	R	15	9	18	13	Ausente	POSITIVOCTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 3B	R	S	R	12	9	16	12	Ausente	POSITIVO CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 4B	I	S	R	19	8	23	11	Ausente	POSITIVO CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 6B	R	S	R	9	9	13	12	Ausente	POSITIVOCTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 7B	I	S	R	9	11	13	15	Ausente	POSITIVOCTX/BOR	AmpC
S. Agona N° 8B	R	S	R	14	9	18	13	Ausente	POSITIVO CTX/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 10B	R	S	R	14	9	17	13	Ausente	POSITIVO CTX/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 11B	R	S	R	15	13	19	18	Ausente	POSITIVOCTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 12B	R	S	R	17	13	18	17	Ausente	POSITIVO CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 13B	R	S	R	17	13	16	16	Ausente	POSITIVO CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 14B	R	S	R	14	9	16	16	Ausente	POSITIVO CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 19B	I	S	R	17	11	20	15	Ausente	POSITIVOCTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 20B	R	S	R	15	10	15	15	Ausente	POSITIVOCTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
S. Heidelberg N° 37B	I	I	R	16	14	20	19	Presente	POSITIVO CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC

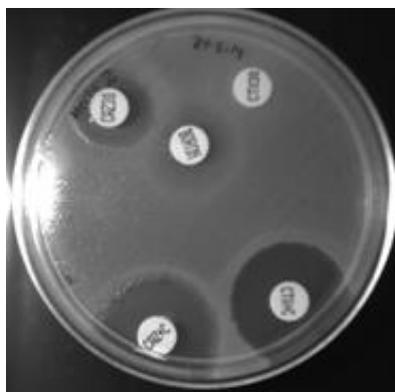
En los 19 aislamientos analizados se confirmó fenotípicamente la presencia de AmpC, esto a veces se dificulta ante la presencia conjunta de enzimas tipo BLEE. En este estudio, la utilización de BOR resultó adecuada para la detección y confirmación de la presencia de  $\beta$ -lactamasa de tipo AmpC.

En éstos aislamientos con fenotipo AmpC, se confirmó genotípicamente la presencia de ésta enzimas (resultados que se mostrarán en el apartado siguiente de esta tesis).

En 13/31 aislamientos estudiados dieron positivos para los ensayos de detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasa BLEE. Aquí se observó una ampliación en la zona de inhibición ( $\geq 5$  mm) en los discos que contenían combinaciones de sustrato/inhibidor al compararlo con la zona del disco que contiene sustrato solamente (Tabla 23).

En la figura 20 se muestra como ejemplo un antibiograma que corresponde a uno de los aislamientos de *Salmonella* (*S. Heidelberg* N°2) donde se observa el agrandamiento en el halo de inhibición de CTX/CLA (30/10  $\mu$ g) y CAZ/CLA (30/10

µg) con respecto a las C3G, CTX (30 µg) y CAZ (30 µg); lo cual confirma la producción de una β-lactamasa de tipo BLEE.



**Figura 20:** Imagen del efecto de la combinación de sustrato/ inhibidor donde se observa el agrandamiento del halo de inhibición con respecto a discos de CTX y CAZ.

**Tabla 23:** Detección de la presencia de β-lactamasas BLEE en los aislamientos de *S. enterica* resistentes a C3G aisladas de aves

Aislamientos	FOX	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/CLA	CAZ/CLA	Aumento ≥ 5 mm	Efecto con BOR	β-lactamasa
S. Heidelberg N° 2 A	S	R	R	9	18	27	26	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 1B	S	R	R	9	20	25	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 28B	S	R	R	9	14	30	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 36B	S	R	R	15	17	25	26	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 37B*	I	I	R	16	14	20	19	Presente	POSITIVO	BLEE-AmpC
S. Heidelberg N° 9B	S	R	R	9	22	23	26	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 15B	S	R	R	13	23	23	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 16B	S	R	R	9	23	24	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 23B	S	R	R	12	20	29	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 24B	S	R	R	9	20	25	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 32B	S	R	R	9	20	26	26	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 33B	S	R	R	9	18	28	25	Presente	NEGATIVO	BLEE
S. Heidelberg N° 38B	S	R	R	11	14	23	27	Presente	NEGATIVO	BLEE

\* El aislamiento *S. Heidelberg* N°37B, figura dos veces en la tabla de β-lactamasas tipo AmpC y BLEE, ya que produce ambas enzimas.

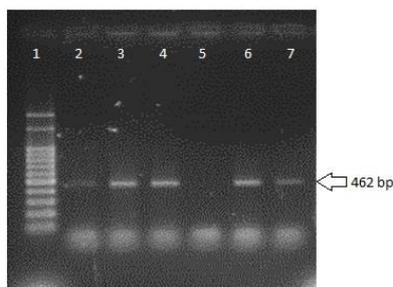
De los 13 aislamientos productores de BLEE recuperados del mismo sistema de producción de aviar, el 39% (13/31) del total de estas enzimas solo estuvieron restringidas a la serovariedad de *S. Heidelberg*.

### Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas

En los 37 aislamientos de *Salmonella* spp. con resistencia a AMP, se llevó a cabo una reacción de PCR para determinar la presencia de  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado (BLEA), empleando como templado ADN total extraído por lisis de colonia. Solo 6 de ellos: 1 *S. Enteritidis* N°3, 1 *S. Sandiego* N° 17B y 4 *S. Heidelberg* N° 21B, 26B, 30B y 31B presentaron la  $\beta$ -lactamasa TEM. Posteriormente, se purificó y se secuenció, describiéndose la variante alélica TEM-1.

Estos aislamientos presentaron resistencia a otras familias de antimicrobianos, como fluoroquinolonas, gentamicina, estreptomycin, tetraciclina y cloranfenicol. Por lo cual, además de poseer *bla*<sub>TEM-1</sub>, se los puede clasificar como aislamientos que presentan multirresistencia (MDR).

Por otro lado, se realizó la PCR *multiplex* para caracterizar genes *ampC* (sobre ADN total extraído por lisis de colonia), en aquellos 19 aislamientos de *Salmonella* spp. donde se detectó fenotípicamente. En todos los aislamientos analizados, se obtuvieron amplicones de tamaño compatible con los fragmentos esperados para los genes pertenecientes al “cluster” CIT (Figura 21). Este “cluster” incluye a los genes *bla*<sub>LAT-1</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>CMY-3</sub>, *bla*<sub>CMY-4</sub>, *bla*<sub>CMY-5</sub>, *bla*<sub>CMY-6</sub>, *bla*<sub>CMY-7</sub>, entre otros.



**Figura 21:** Amplicones obtenidos por PCR *multiplex*. **Calle 1:** marcador de peso molecular 100 bp (Inbio Higway), **calle 2:** *S. Agona* N° 2B, **calle 3:** *S. Heidelberg* N° 3B, **calle 4:** *S.*

Agona N° 8B, **calle 5**: control negativo, **calle 6**: *S. Heidelberg* N° 20B y **calle 7**: control positivo “*cluster*” CIT, *S. Typhimurium* 10/16.

En base a los resultados obtenidos en la PCR *multiplex*, se intentó amplificar en forma completa el gen *bla<sub>CMY</sub>* utilizando como templado ADN total y los *primers* específicos CMY-F y CMY-R. Se pudo amplificar el gen completo *bla<sub>CMY</sub>* y se secuenció. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen completo permitió evidenciar que todas las *Salmonellas* spp. analizadas fueron portadoras de *bla<sub>CMY-2</sub>* (Tabla 24).

Esta constituye la primera detección de CMY-2 en *Salmonellas* spp. recuperadas de producción intensiva de aves de nuestra región. Es importante destacar que todos los aislamientos positivos para la variante de esta enzima, fueron encontrados en aislamientos pertenecientes a granjas de la provincia de Entre Ríos (Colón y Concepción del Uruguay). De los 19 aislamientos portadores de CMY-2, 15 de estos aislamientos correspondieron a la serovariedad *S. Heidelberg*.

Debido al patrón de resistencia a C3G, y de acuerdo a los resultados de la detección fenotípica obtenidos, se determinó la presencia de genes codificantes de BLEE como *bla<sub>CTX-M</sub>* utilizando *primers* universales para la amplificación mediante PCR de genes *bla<sub>CTX-M-like</sub>*. Se obtuvo un amplicón del tamaño esperado, aproximadamente 500 bp, por lo cual, posteriormente se realizaron otras reacciones de PCR empleando *primers* específicos para caracterizar los diferentes grupos dentro de CTX-M: *bla<sub>CTX-M-1, M-2, M-8, M-9 Y M-25</sub>*. Se ensayaron reacciones de PCR para la detección de PER-1, PER-2, OXA-1 y OXA-2, pero todas las reacciones dieron negativas.

Se obtuvieron 5 PCR positivas para los genes del grupo CTX-M del grupo 2 y 9 reacciones positivas para los genes CTX-M del grupo 9. Los amplicones obtenidos fueron purificados y secuenciados.

Luego del análisis de la secuencia nucleotídica las BLEE fueron caracterizadas como miembros de CTX-M-14 (n=8) and CTX-M-2 (n=3) (Tabla 24). Solo un aislamiento, *S. Heidelberg* N°28B posee ambas variantes CTX-M-14 y CTX-M-2; y *S. Heidelberg* N°37B contiene la variante CTX-M-2 y CMY-2.

**Tabla 24:** Caracterización molecular de las  $\beta$ -lactamasas presentes en aislamientos de *S. enterica* recuperadas de aves\*.

Serovariedad	Aislamientos	Ciudad/Provincia	Año/Período	AmpC	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
<i>S. Typhimurium</i>	N°1	Colón, ER	2010	CMY-2	-	-
<i>S. Oranienburg</i>	-	Concepción del Uruguay, ER	2011	CMY-2	-	-
<i>S. Havanna</i>	-	Concepción del Uruguay, ER	2011	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 1B	Exaltación de la Cruz, BsAs	2011-2012	-	CTX-M-2	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 2A	Exaltación de la Cruz, BsAs	2011	-	CTX-M-2	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 3A	Carmen de Areco, BsAas	2011	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 4A	Colón, ER	2011	CMY-2	-	-
<i>S. Agona</i>	N° 2B	Colón, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 3B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 4B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 6B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 7B	Carmen de Areco, BsAas	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Agona</i>	N° 8B	Colón, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 9B	Colón, ER	2011-2012		CTX-M-14	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 10B	Colón, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 11B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 12B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 13B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 14B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 15B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	CTX-M-14	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 16B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	CTX-M-14	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 19B	Colón, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 20B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	-	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 23B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	CTX-M-14	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 24B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	CTX-M-14	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 28B	Villaguay, ER	2011-2012	-	CTX-M-14 +CTX-M-2	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 32B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	CTX-M-14	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 33B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	CTX-M-14	-
<i>S. Heidelberg</i>	N° 36B	San Antonio de Areco, BsAs	2011-2012	-	CTX-M-2	-

S. Heidelberg	N° 37B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	CMY-2	CTX-M-2	-
S. Heidelberg	N° 38B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	CTX-M-14	-
S. Enteritidis	N° 3	Paraná, ER	2011-2012	-	-	TEM-1
S. Sandiego	N° 17B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	-	TEM-1
S. Heidelberg	N° 21B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	-	TEM-1
S. Heidelberg	N° 26B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	-	TEM-1
S. Heidelberg	N° 30B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	-	TEM-1
S. Heidelberg	N° 31B	Concepción del Uruguay, ER	2011-2012	-	-	TEM-1

\* Todos los aislamientos muestreados durante el año 2011-2012 pertenecen a pollos parrilleros; mientras que el resto de los aislamientos fueron recuperados de gallinas ponedoras.

### Detección de genes PMQR

La caracterización molecular de los determinantes PMQR se llevó a cabo en todos los aislamientos de *S. enterica* recuperadas de aves; mediante amplificación por PCR de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6)-lb-cr* y las bombas de eflujo *qepA* y *oqxAB*.

El determinante PMQR prevalente dentro de todos los aislamientos analizados fue *qnrB*. En la serovariedad *S. Heidelberg*, *qnrB* fue detectado en el 89,5% (34/38) de los aislamientos analizados. Se seleccionaron al azar, 7/34 aislamientos de *S. Heidelberg* para purificar el producto de PCR obtenido y posterior secuenciación. En todos los casos se describió la variante alélica *qnrB5*.

Del total de las otras serovariedades el 51,6 % (16/31) de los aislamientos presentó el gen *qnrB*. Cabe destacar que el producto de PCR para *qnrB* de 7 aislamientos de diferentes serovariedades seleccionados al azar (*S. Oranienburg*, *S. Anatum*, *S. Schwarzengrund* N°2 y N°3, *S. Sandiego*, *S. Agona*, *S. Enteritidis* N°3) fueron secuenciados y analizados al que en los aislamientos de *S. Heidelberg*, la variante alélica encontrada fue exclusivamente *qnrB5*.

Ninguno de los otros marcadores PMQRs ensayados como *qnrA*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *aac(6)-lb-cr* y los genes que codifican para las bombas de eflujo *qepA*, *oqxAB*; fueron detectados en los 69 aislamientos analizados.

No se encontró asociación, entre la presencia del determinante *qnrB* y la resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G) o la presencia de las enzimas CTX-M o CMY ( $p > 0,05$  Test Fisher).

#### Determinación del fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a FQ

Con el test de difusión en disco empleando solo NAL o CIP, se puede definir dos fenotipos principales: resistencia completa a quinolonas (halo de inhibición tanto para NAL como para CIP de 9 mm) y sensibilidad completa a quinolonas (con halos de inhibición para NAL de  $\geq 19$ mm y para CIP  $\geq 31$ mm), el resto de los fenotipos se denominan inusuales, con sensibilidad disminuida (con halos de inhibición para CIP entre un rango de 21-30mm). Estos fenotipos constituyen la "zona gris" para las quinolonas, ya que la mayoría de ellos representan un reto a nivel de laboratorio para categorizar la sensibilidad de las mismas.

Además, se incorporó al análisis el antimicrobiano ENR, por ser de elección para el tratamiento de numerosas infecciones en animales, y al estudiar el perfil de sensibilidad acompañado de otras FQ, nos permitirá establecer relaciones en cuanto a su patrón de sensibilidad.

El análisis de fenotipos de sensibilidad a FQ, se realizó en forma discriminada, por un lado solo con los aislamientos de *S. Heidelberg* (Tabla 25), la serovariedad prevalente y por otro lado, con el resto de los serovariedades (Tabla 26).

**Tabla 25:** Interpretación del test de difusión en discos evaluando la sensibilidad a fluoroquinolonas en los aislamientos de *S. Heidelberg* (n=38), analizados en base a los criterios establecidos por CLSI

NAL	CIP	ENR	<i>qnrB</i>
S a NAL (8)	S a CIP (8)	S a ENR (8)	5/8
I a NAL (3)	S a CIP (1)	S a ENR (3)	3/3
	I a CIP (2)		
R a NAL (27)	S a CIP (4)	S a ENR (4)	4/4
	I a CIP (12)	S a ENR (4)	4/4

		I a ENR (8)	8/8
	R a CIP (11)	S a ENR (1)	1/1
		I a ENR (9)	8/9
		R a ENR (1)	1/1

Entre paréntesis se indicó la cantidad de aislamientos con el fenotipo S (sensible), I (intermedio) y R (resistente) a NAL (ác. nalidíxico), CIP (ciprofloxacina) y ENR (enrofloxacina). También se señaló la cantidad de aislamientos portadores del determinante PMQR, *qnrB*.

Como se observa en la Tabla 25, 11/38 (29%) aislamientos poseen resistencia completa a NAL y CIP, y solo un aislamiento posee resistencia a ENR, y en 10/11 aislamientos se observó el determinante PMQR, *qnrB*.

En *S. Heidelberg* se observó que aquellos aislamientos con sensibilidad a NAL, nunca presentan sensibilidad disminuida (I) o resistencia a CIP, igualmente en aquellos aislamientos con sensibilidad disminuida a NAL, no muestran resistencia a CIP. Solo en aquellos aislamientos R a NAL, puede presentar las tres variantes de S, I y R a CIP.

En 12 de los 27 aislamientos con resistencia a NAL, se deberían informar que tienen el fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a ciprofloxacina, por lo cual no sería el antimicrobiano de elección a la hora del tratamiento. Además, al analizar la ocurrencia de los determinantes PMQR, en estos aislamientos, se puede observar que los 12 aislamientos presentaron genes *qnrB*.

Solo 8 aislamientos poseen el fenotipo salvaje, es decir completamente sensibles a NAL, CIP y ENR. No todos ellos mostraron la presencia de genes *qnrB* (presente en 5/8 aislamientos).

**Tabla 26:** Interpretación del test de difusión en discos evaluando la sensibilidad a fluoroquinolonas en los aislamientos de *S. enterica* (n=31), analizados en base a los criterios establecidos por CLSI

<b>NAL</b>	<b>CIP</b>	<b>ENR</b>	<b><i>qnrB</i></b>
<b>S a NAL</b> (17)	<b>S a CIP</b> (17)	<b>S a ENR</b> (17)	5/17
<b>I a NAL</b> (3)	<b>I a CIP</b> (3)	<b>S a ENR</b> (2)	2/2
		<b>I a ENR</b> (1)	0/1
<b>R a NAL</b> (11)	<b>S a CIP</b> (1)	<b>S a ENR</b> (1)	0/1
	<b>I a CIP</b> (8)	<b>S a ENR</b> (1)	1/1
		<b>I a ENR</b> (7)	4/7
	<b>R a CIP</b> (2)	<b>I a ENR</b> (2)	2/2

Entre paréntesis se indicó la cantidad de aislamientos con el fenotipo S (sensible), I (intermedio) y R (resistente) a NAL (ác. nalidíxico), CIP (ciprofloxacina) y ENR (enrofloxacin). También se señaló la cantidad de aislamientos portadores del determinante PMQR, *qnrB*.

Al comparar los resultados obtenidos para el resto de las serovariedades y compararlas con *S. Heidelberg*, (Tabla 25) observamos discrepancias en la proporción de fenotipos encontrados y se encontró que solo 2 aislamientos presentan el fenotipo resistente a quinolonas ensayadas y ambos aislamientos poseen el determinante *qnrB*.

En 8 de los 11 aislamientos con resistencia a NAL, se deberían informar que tienen el fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a ciprofloxacina. Pero en estos, solo se observó 5/11 aislamientos mostraron el gen *qnrB*.

Existe una mayor proporción de aislamientos con el fenotipo salvaje completamente sensible [17/31 (54,8%)], comparada con *S. Heidelberg* y con una menor portación de genes *qnrB* (5/17).

Cuando se analizó el perfil de sensibilidad a NAL de la totalidad de los aislamientos estudiados (n=69) de *Salmonella spp.* se observó una correlación entre la presencia de genes *qnrB* y la sensibilidad disminuida o resistencia a NAL (p= 0,0001). Del mismo modo se observó similar correlación cuando se analizó la presencia de genes codificando para el determinante *qnrB* y el comportamiento frente a CIP (p=0,0007).

Al incorporar a los ensayos de difusión con discos, el antimicrobiano pefloxacina (PEF, 5 µg/ml) conjuntamente con discos para el resto de las FQ, nos permitió diferenciar aquellos aislamientos de *Salmonella* spp. que presentan un fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a CIP (halo de inhibición a CIP entre 21-30 mm), siguiendo los lineamientos establecidos por Whonet (93) (Tabla 27). Esto se realizó comparando los diámetros del halo de inhibición obtenido para CIP, NAL y PEF y se determinó el fenotipo al que corresponde.

**Tabla 27:** Determinación del fenotipo de sensibilidad a FQ en *S. enterica* empleando los lineamientos de Whonet

Fenotipo	CIP (mm)	NAL (mm)	PEF (mm)	<i>S. enterica</i> (n=69)	<i>qnrB</i>	Interpretación
3	21-30	≤20	≤23	27	22/27	Sensibilidad disminuida a FQ
4		≥ 21	≥ 24	3	1/3	

Como se observa en la Tabla 27, solo 30/69 aislamientos de *S. enterica* presentaron sensibilidad disminuida a CIP, es decir con un halo de inhibición de 21-30 mm. La mayoría de ellos pertenecen al fenotipo 3 (27/69), y solo 3 aislamientos presentaron el fenotipo 4. Solo 23/30 de los aislamientos poseen el gen *qnrB*.

El fenotipo 4 (según propone Whonet) se asocia a la producción de la enzima *aac(6)-Ib-cr*; solo 3 aislamientos fueron identificados con este fenotipo, pero fueron todos negativos cuando se ensayó la PCR para determinar el gen que codifica para esta enzima.

Estos resultados nos permiten inferir que la gran mayoría de los aislamientos con sensibilidad disminuida a CIP (27/30; 90%) fueron resistentes a PEF, y casi todos los aislamientos resistentes a PEF amplificaron para el gen *qnrB*. Es probable que este determinante explique, en parte, la sensibilidad disminuida (inusual) a CIP observada.

#### Caracterización epidemiológica de los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperadas de aves mediante PFGE

Las técnicas de tipificación son herramientas útiles porque permiten conocer la clonalidad entre los aislamientos, identificar los reservorios y determinar posibles vías de transmisión. La electroforesis en campo pulsado (PFGE), es la técnica de referencia de tipificación debido a que tiene un elevado poder de discriminación y se ha convertido en el método de referencia de tipificación para la mayoría de las bacterias con interés epidemiológico. Se basa en la separación electroforética en campo pulsado del ADN cromosómico digerido con enzimas de restricción con una baja frecuencia de corte. Los perfiles de ADN generados (pulsotipos) presentan entre 10 y 30 fragmentos de ADN con un tamaño que varía entre 10 y 800 Kb.

Fueron seleccionados para la subtipificación mediante PFGE empleando la enzima *Xba*I; 20 aislamientos representativos de *S. Heidelberg* que presentaron como mecanismo de resistencia a C3G, las  $\beta$ -lactamasas del tipo CMY o CTX-M. Se incorporaron al análisis algunos aislamientos sensibles a C3G (Tabla 28).

**Tabla 28:** Aislamientos de *S. Heidelberg* subtipificados mediante PFGE

Aislamientos	Denominación en el PFGE	Genes de resistencia y/o perfil de antibiograma
S. Heidelberg N° 1B	(SH1B)	CTX-M-2
S. Heidelberg N°3B	(SH3B)	CMY-2
S. Heidelberg N°5B	(SH5B)	GEN-TET-CLR-CFT
S. Heidelberg N°6B	(SH6B)	CMY-2
S. Heidelberg N°7B	(SH7B)	CMY-2
S. Heidelberg N°9B	(SH9B)	CTX-M-14
S. Heidelberg N°10B	(SH10B)	CMY-2
S. Heidelberg N°11B	(SH11B)	CMY-2
S. Heidelberg N°12B	(SH12B)	CMY-2
S. Heidelberg N°14B	(SH14B)	CMY-2
S. Heidelberg N°16B	(SH16B)	CTX-M-14
S. Heidelberg N°19B	(SH19B)	CMY-2
S. Heidelberg N°20B	(SH20B)	CMY-2
S. Heidelberg N°23B	(SH23B)	CTX-M-14
S. Heidelberg N°24B	(SH24B)	CTX-M-14
S. Heidelberg N°28B	(SH28B)	CTX-M-14 + CTX-M-2
S. Heidelberg N°32B	(SH32B)	CTX-M-14
S. Heidelberg N°33B	(SH33B)	CTX-M-14
S. Heidelberg N°37B	(SH37B)	CMY-2 y CTX-M-2
S. Heidelberg N°38B	(SH38B)	CTX-M-14

La interpretación de los pulsotipos obtenidos se realizó siguiendo el protocolo de trabajo consensuado para *Salmonella* spp. y *E. coli* (**Red de PulseNet**

**Internacional**), donde se emplea el *software* específico “*Bionumerics*” (Applied Maths).

Este programa realiza la normalización del gel, determina el porcentaje de tolerancia en la posición de las bandas y punto de corte de similitud para definir *clusters*. Con el pulsotipo obtenido se construyó empleando una matriz de distancia teniendo en cuenta el coeficiente de Dice. Luego se obtuvo el dendograma por el método de agrupamiento de **UPGMA** (“*unweighted pair group method with arithmetic mean*”).



**Figura 22:** Dendograma donde se observó el grado de relación genética entre los aislamientos de *S. Heidelberg* estudiados, utilizando el programa *BioNumerics*.

Analizando el dendograma obtenido (Figura 22) se observó cuatro patrones de bandas diferentes: ARJF6X01.0025, ARJF6X01.0026, ARJF6X01.0027 y ARJF6X01.0028. El patrón obtenido con mayor frecuencia fue el ARJF6X01.0025 en 16/20 (80%) aislamientos; esto demuestra relación de clonalidad entre las *S. Heidelberg* analizados.

Al analizar los resultados obtenidos, podemos inferir que estos aislamientos poseen plásmidos con diferentes determinantes de resistencia que se movilizarían entre cepas pertenecientes a un mismo clon, destacándose la promiscuidad de éste.

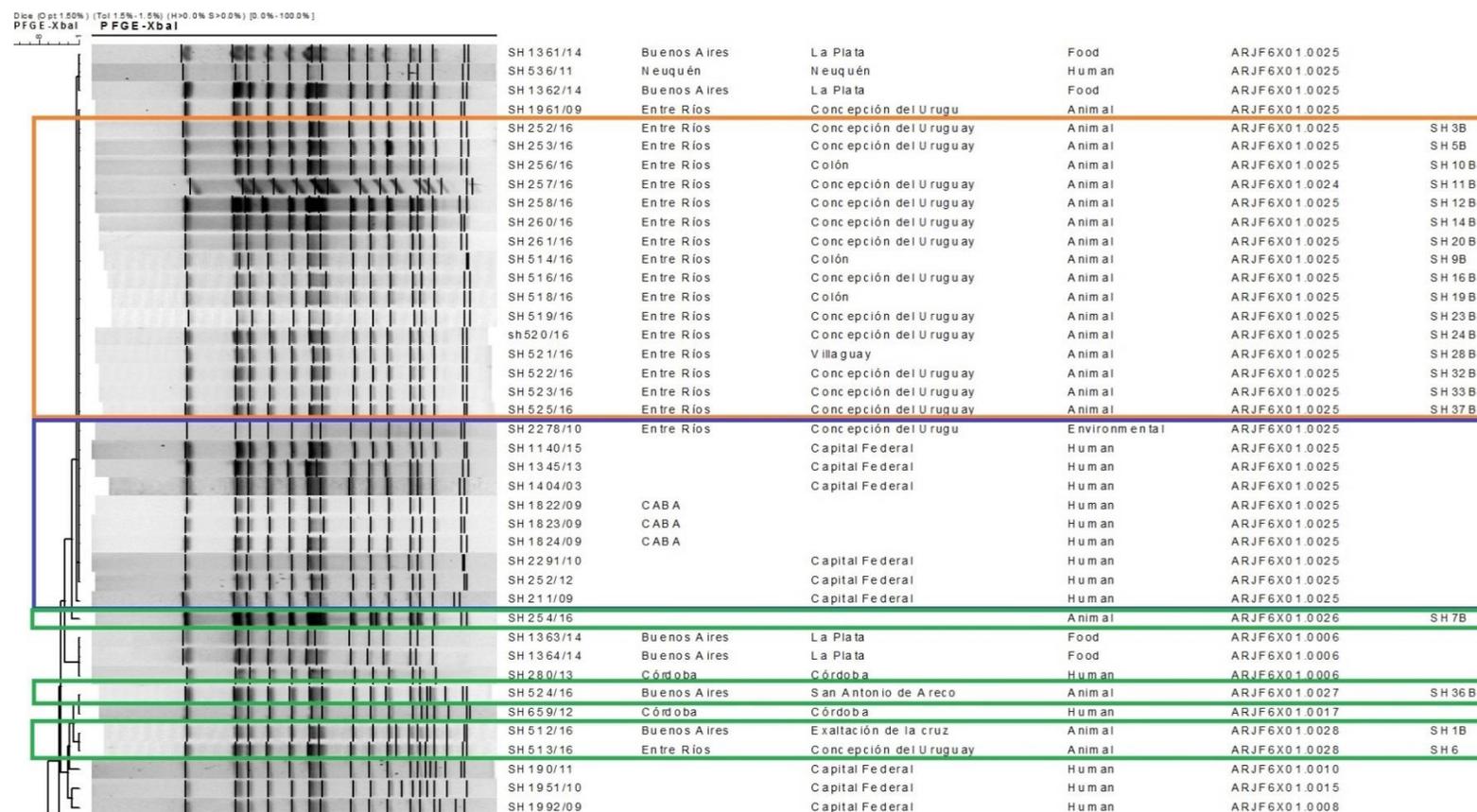
Además de analizar la clonalidad entre las cepas estudiadas, se realizó la comparación del pulsotipo obtenido con el resto de los patrones almacenados en la base de datos existente en la **Red de PulseNet Internacional**. Esta ventaja de disponer de perfiles genéticos de un determinado microorganismo, nos permite detectar episodios ocultos de transmisión de un determinado patógeno, que no siempre se reflejan en un aumento llamativo de casos o brotes.

Según la base de datos Nacional de *Salmonella* spp. se cuenta con 78 aislamientos de esta serovariedad, que generaron 23 patrones diferentes con la enzima XbaI. De los cuales el 5,1% (4/78) pertenecen a aislamientos de origen ambiental, 6,4% (5/78) aislamientos provenientes de alimentos, 35,9% (28/78) aislamientos de origen humano y el 52,6% (41/78) aislamientos de origen animal.

La frecuencia con la que aparece el pulsotipo ARJF6X01.0025 es de 0,384 veces, es decir este patrón se repite en 30 aislamientos de los 78 aislamientos totales. Es decir, que aparte de los aislamientos pertenecientes a este estudio, existen 14 aislamientos pertenecientes a la base de datos, que presentan el mismo pulsotipo.

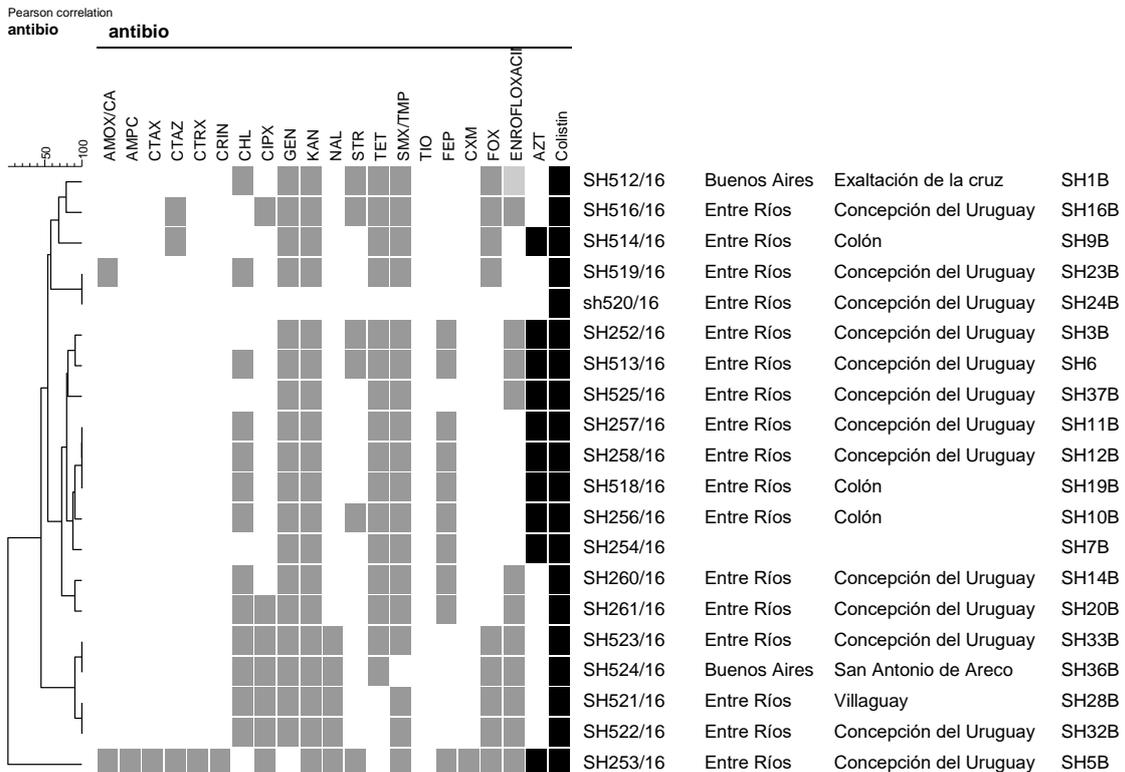
Ninguno de los aislamientos analizados en nuestro estudio, puede ser asociado o ser el responsable de algún brote; pero analizando el patrón ARJF6X01.0025, es notable destacar que éste aparece en 10 aislamientos de origen humano (muestras proveniente de diferentes hospitales de la provincia de Buenos Aires; durante los años: 2003 (n=1 aislamiento), 2009 (n=4), 2010 (n=1), 2012 (n=1), 2013(n=1), 2015 (n=1), mientras que 1 solo aislamiento fue del año 2011 perteneciente a un caso registrado en la provincia de Neuquén).

Otros aislamientos que presentaron el mismo patrón fueron: 2 aislamientos obtenidos desde alimentos (2014), 1 de origen ambiental (2010) y otro de origen animal (2009) (Figura 23).



**Figura 23:** Dendrograma de relación genética entre los aislamientos de *S. Heidelberg*, con el resto de la base de datos de la Red de PulseNet Internacional. Naranja: aislamientos pertenecientes a este trabajo con el pulstipo ARJF6X01.0025, azul: aislamientos depositados en la base de datos con el mismo pulstipo, verde: aislamientos de *S. Heidelberg* con otros pulstipos.

Empleando el mismo programa, se realizó una comparación de relación filogenética en base a la sensibilidad antimicrobiana que presentan los aislamientos analizados (Figura 24).



**Figura 24:** Dendrograma generado en base a la sensibilidad antimicrobiana que presentan los aislamientos analizados. Símbolos: cuadrados en blanco, indican resistencia; cuadrados grises, indican sensibilidad intermedia y los cuadrados negros: sensibles.

El análisis mediante la digestión con XbaI y posterior PFGE de los aislamientos portadores de enzimas de tipo BLEE y AmpC y su comparación con el perfil de antimicrobianos ensayados (Figura 24), nos permite inferir que los aislamientos analizados se agruparon en el mismo *cluster* independientemente de la enzima que presenten.

Estos datos demuestran que mediante esta técnica de tipificación genotípica, fue posible establecer relaciones entre los aislamientos analizados en este trabajo de tesis con los depositados en la base de datos nacional, y se puede vislumbrar que

se trata de un clon con distintos determinantes de resistencia y que presenta una alta flexibilidad para el intercambio de material genético extracromosómico. A su vez, se muestra que este clon, no se encuentra limitado a una granja en particular, sino que circula en las diferentes granjas de las dos provincias analizadas. Este tipo de herramientas debería tenerse en cuenta, a la hora de diseñar programas de control en cada granja, basadas en medidas de bioseguridad y de higiene, que podrían reducir considerablemente la dispersión de estas bacterias multirresistentes.

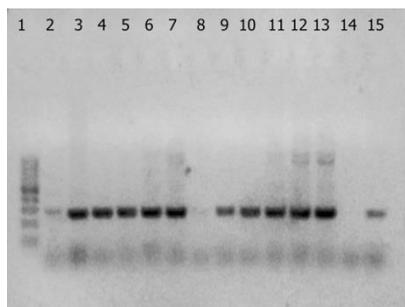
### **Evaluación de la transmisibilidad de los genes implicados en la resistencia**

Con el objetivo de evaluar la transmisibilidad de la resistencia a C3G y fluoroquinolonas, mediante elementos genéticos móviles como plásmidos conjugativos y movilizables, se seleccionaron diferentes aislamientos de *S. Heidelberg* con distintos perfiles de resistencia y se llevaron a cabo ensayos de conjugación y electroporación.

Se logró eficientemente la transferencia plasmídica mediante conjugación y electroporación.

La electroporación se consiguió utilizando como cepa recepta *E. coli* XL1 Blue transformando con el plásmido obtenido de *S. Heidelberg* N°31B. Este aislamiento contiene el determinante *qnrB5* y TEM-1.

Se realizó la extracción del plásmido siguiendo el protocolo de Kado y Liu (94). Luego de la electroporación, se seleccionó en placas de TSA conteniendo el antibiótico AMP (20 µg/ml). Se seleccionaron algunas colonias y se repicaron en medio conteniendo CIP (0,064 µg/ml). Posteriormente, se seleccionaron las colonias (n=11) para analizar por PCR el gen *qnrB* (Figura 25) y se realizó el perfil de sensibilidad antimicrobiana (Tabla 29).



**Figura 25:** Reacción de PCR, donde se comprobó la eficiente transferencia del determinante PMQR a la cepa receptora mediante electroporación. **Calle 1:** marcador de peso molecular 100 bp (Inbio Higway), **calle 2-13:** diferentes colonias obtenidas por electroporación, **calle 14:** control negativo cepa receptora, **calle 15:** control positivo cepa dadora.

Se logró exitosamente la transferencia del plásmido portador del gen *qnrB5*, con lo que se confirmó su codificación plasmídica.

Para los aislamientos de *S. Heidelberg* N° 1B, 9B, 10B, 33B Y 37B, se realizó la conjugación en medio sólido, empleando la cepa receptora *E. coli* J53.

Se seleccionó en medio TSA, empleando dos combinaciones diferentes de agentes para la selección: azida sódica (200 µg/ml)+ AMP (20 µg/ml); azida sódica (200 µg/ml)+ CTX (1 µg/ml). Se incubó a 37°C ON. Las colonias resultantes fueron repicadas en medio levine conteniendo la misma concentración de antibióticos; se observó a las 24 horas solo el crecimiento de colonias lactosa positiva, lo que indican el éxito de la conjugación en *E. coli* J53. Al igual que en el ensayo de electroporación, se realizó el cribado de los transconjugantes mediante PCR y se realizó el perfil de sensibilidad a antibióticos (Tabla 29).

**Tabla 29:** Perfil de sensibilidad antimicrobiana y confirmación por PCR de la eficiencia de conjugación en los aislamientos de *S. Heidelberg* y en las cepas transconjugantes y receptoras

Aislamiento	Mec. de R a C3G	Mec. de R a FQ	AMP	CRO	CFT	CFO	FEP	NAL	CIP	ENR	TET	COL	ST
<b>1B</b>	CTX-M-2	<i>qnrB5</i>	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S	S
<b>1B-TC</b>	+	-	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<b>9B</b>	CTX-M-14	<i>qnrB5</i>	R	R	R	S	R	R	R	I	S	S	I
<b>9B-TC</b>	+	-	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<b>10B</b>	CMY-2	<i>qnrB5</i>	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	S
<b>10B-TC</b>	+	-	R	I	I	R	S	S	I	S	S	S	S
<b>33B</b>	CTX-M-14	-	R	R	R	S	R	S	I	S	S	S	I
<b>33B-TC</b>	+	-	R	R	R	S	R	S	I	S	S	S	S
<b>37B</b>	CTX-M-2+ CMY-2	<i>qnrB5</i>	R	R	R	I	I	R	R	S	S	S	I
<b>37B-TC</b>	+	-	R	I	I	I	I	S	I	S	S	S	S
<b>E.coli J53</b>	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>31B</b>	TEM-1	<i>qnrB5</i>	R	S	R	S	S	R	R	I	R	S	I
<b>31B-TC</b>	-	+	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	S
<b>E.coli XL1-blue</b>	-	-	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S

Antimicrobianos ensayados: AMP: ampicilina; CRO: ceftriaxona, CFT: ceftiofur; CFO: cefoxitina; FEP: cefepime; NAL: ác. nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; TET: tetraciclina; COL: colistina y ST: estreptomicina.

Se logró exitosamente la transferencia del plásmido para los aislamientos de *S. Heidelberg* N° 1B, 9B, 10B, 33B Y 37B. Al analizar la resistencia co-transferida por el pasaje del plásmido, se observó resistencia a solo las C3G ensayadas y no a FQ; con lo cual se confirmó la transferencia del plásmido portando las  $\beta$ -lactamasa BLEE y de tipo AmpC. No se observó co-resistencia a otros antimicrobianos.

En el aislamiento de *S. Heidelberg* N°31 B, aunque fue positiva a la reacción de PCR para el gen *qnrB*, el perfil de sensibilidad del transconjugante obtenido fue diferente a la cepa dadora. Lo cual indica una posible contaminación con otro aislamiento con características diferentes a las esperadas y no sería el aislamiento que se pretendía obtener.

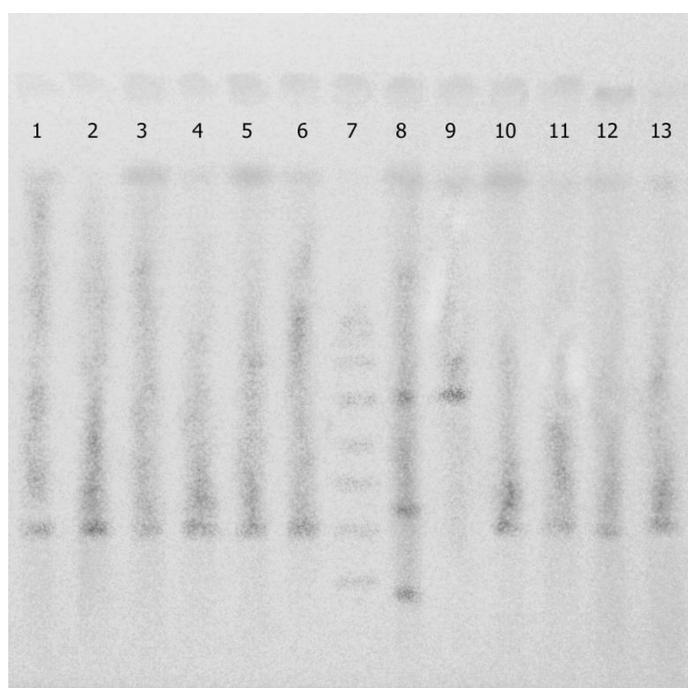
### Estimación del tamaño y el grupo de incompatibilidad de los plásmidos transferidos

Con el objetivo de estimar el tamaño de los plásmidos responsables del fenotipo de resistencia observado en los aislamientos de *S. Heidelberg* seleccionados; se

realizó la digestión de los plugs conteniendo ADN total con nucleasa S1, tanto de las cepas dadoras como de los transconjugantes de cada uno de los aislamientos.

Luego de este tratamiento, se resolvieron mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). La estimación del tamaño fue realizada por comparación con el marcador de *ProMega-Markers Lambda Ladders*, que posee un patrón de bandas de 50- 800 Kb.

Se pudieron estimar con éxito el tamaño de los plásmidos de todos los aislamientos analizados (Figura 26).

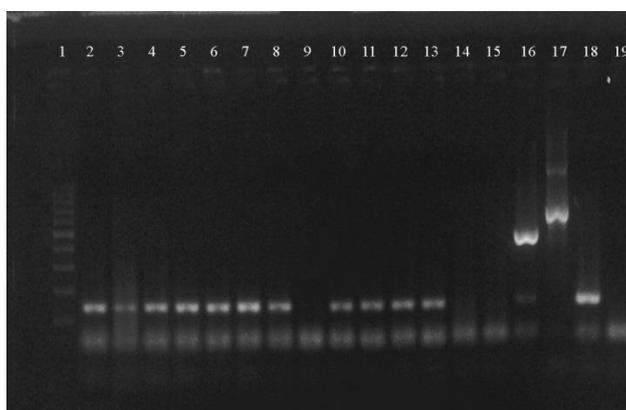


**Figura 26:** PFGE con nucleasa S1 de *S. Heidelberg*. **Calle 1:** 1B, **calle 2:** 1B-TC, **calle 3:** 9B, **calle 4:** 9B-TC, **calle 5:** 10B, **calle 6:** 10B-TC, **calle 7:** marcador de peso molecular, **calle 8:** 31B, **calle 9:** 31B-TC, **calle 10:** 33B, **calle 11:** 33B-TC, **calle 12:** 37B y **calle 13:** 37B-TC.

Los aislamientos de *S. Heidelberg* N° 1B, 1B-TC, 9B, 9B-TC, 10B, 10B-TC, 33B, 33B-TC, 37B y 37B-TC, todos poseen un plásmido de alrededor de 100 Kb. En el aislamiento *S. Heidelberg* N° 31B, se observó que posee más de un replicón, con diferentes tamaños, uno de alrededor de 250 Kb, otro de alrededor de 120 Kb y un tercero de menor tamaño, alrededor de 50 kb.

En un ensayo diferente, se realizó la tipificación molecular de los plásmidos mediante diferentes reacciones de PCR que permitieron determinar el grupo de incompatibilidad.

Tanto los aislamientos de cepas dadoras como los transconjugantes de *S. Heidelberg* N° 1B, 1B-TC, 9B, 9B-TC, 10B, 10B-TC, 31B, 33B, 33B-TC, 37B y 37B-TC dieron positivas a la reacción de PCR *multiplex*, solo para el grupo de incompatibilidad Incl 1, donde se obtuvo un amplicón de un tamaño de 139 pb (Figura 27).



**Figura27:** Tipificación de grupos de incompatibilidad en *S. Heidelberg*. **Calle 1:**100bp, **calle 2:** 1B, **calle 3:** 1-TC, **calle 4:** 9B, **calle 5:** 9-TC, **calle 6:** 10B, **calle 7:** 10-TC, **calle 8:** 31B, **calle 9:** 31-TC, **calle 10:** 33B, **calle 11:** 33-TC, **calle 12:** 37B, **calle 13:** 37-TC, **calle 14:** *E. coli* XL1-blue, **calle 15:** *E. coli* J53, **calle 16:** control + HI1, **calle 17:** control + HI2, **calle 18:** control + I1 y **calle 19:** control negativo.

#### Detección de genes codificantes del sistema toxina-antitoxina

Tanto a los cepas dadoras como a los transconjugantes obtenidos de los aislamientos de *S. Heidelberg* que se vienen caracterizando, se les realizó extracción de ADN total por lisis y posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de PCR simples empleando *primers* específicos, con el objetivo de buscar la presencia de los genes codificando para los sistemas toxina-antitoxina (TA) más comunes en enterobacterias: *pemK*, *ccdA-B*, *relE*, *parD-E*, *vagC-D*, *hok-sok*, *pndA-C* y *srnB-C*. Luego se resolvieron en geles de agarosa al 1,5%, empleando el marcador

de peso molecular 100 bp (Inbio Highway). Se obtuvieron los resultados que se resumen en la (Tabla 30).

**Tabla 30:** Determinación del grupo de incompatibilidad y de los sistemas toxina-antitoxina (TA) en los aislamientos de *S. Heidelberg* dadoras y transconjugantes

Aislamientos	Grupo de Incompatib.	Tamaño del plásmido	Sistema Toxina-Antitoxina							
			<i>pemK</i>	<i>hok-sok</i>	<i>ccdA-B</i>	<i>srnB-C</i>	<i>relE</i>	<i>pndA-C</i>	<i>vagC-D</i>	<i>parD-E</i>
<b>1B</b>	I1	100	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>1B-TC</b>	I1	100	-	-	-	-	+	+	-	+
<b>9B</b>	I1	100	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>9B-TC</b>	I1	100	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>10B</b>	I1	100	-	-	+	-	-	+	-	-
<b>10B-TC</b>	I1	100	-	-	+	-	-	+	-	+
<b>31 B</b>	I1	<50-120-250	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>33 B</b>	I1	<100	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>33 B-TC</b>	I1	<100	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>37 B</b>	I1	<100	-	-	+	-	-	+	-	-
<b>37 B-TC</b>	I1	<100	-	-	+	-	+	+	-	+
<b>E. coli J53</b>	-		-	-	-	-	+	-	-	+
<b>E. coli XL1 Blue</b>	-		-	+	+	+	+	-	-	+

Los aislamientos de *S. Heidelberg* N° 1B, 1B-TC, 9B, 9B-TC, 10B, 10B-TC, 31B, 33B, 33B-TC y 37B y 37B-TC, dieron positivas a la reacción de PCR para el gen del sistema TA, *pndA-C*. Solo los aislamientos 10B, 10B-TC, 37B y 37B-TC también dieron positivos al gen *ccdA-B*.

Siendo los sistemas *pndA-C* y *ccdA-B* los que estarían participando en la perpetuidad de éstos plásmidos.

# Discusión

*S. enterica* es un patógeno zoonótico causante de enfermedades transmitidas por alimentos y representa un importante problema de Salud Pública. Como los animales son el principal reservorio, su papel es esencial en la epidemiología de esta enfermedad. Por ello, es necesario que se lleven a cabo programas de monitoreo, donde la vigilancia epidemiológica y el perfil de resistencia de esta bacteria en animales sea el esquema principal a seguir, ya que los alimentos de origen animal son la fuente de la gran mayoría de *Salmonella* no tíficas.

Este trabajo de tesis se inició con el estudio de *Salmonella* spp. de dos poblaciones diferentes, aislamientos recuperados de bovinos, equinos y posteriormente se estudiaron aislamientos recuperados a partir de animales sanos de sistemas intensivos de producción de pollos parrilleros y gallinas ponedoras.

Hasta el momento de producción de esta tesis, no se habían realizado en nuestro país, estudios de sensibilidad a C3G, fluoroquinolonas, colistina y otros antimicrobianos en aislamientos de *Salmonella* spp. de origen animal, que permitieran conocer los niveles de resistencia existentes y los mecanismos asociados.

Analizando los aislamientos de *S. enterica* obtenidas a partir de bovinos entre los años 1998-2012, la serovariedad prevalente en estos aislamientos fue *S. Typhimurium* con un 59,3% (16/27). Lo cual es coincidente con los datos reportados en el año 2012 por Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos Malbrán” (INEI-ANLIS), organismo encargado de llevar a cabo la vigilancia y establecer las serovariedades de *Salmonella* spp. prevalentes en los aislamientos remitidos para su estudio; informaron que *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son los dos serovariedades comúnmente encontradas (121).

En esta población, se observó un bajo número de aislamientos con resistencia C3G y a fluoroquinolonas. En *Salmonella* spp. recuperadas de equinos (n=11), predominó la sensibilidad solo a TET (4/11) y a SXT (8/11) . Ninguno de los aislamientos de bovinos mostró sensibilidad disminuida o resistencia a los carbapenemes IMI y MER. Tampoco se observó resistencia a COL. Una situación muy parecida fue observada en el perfil de sensibilidad antimicrobiana obtenida

para *Salmonella* spp. en bovinos (n=27), donde solo fue importante el porcentaje de sensibilidad observados a TET (37%) y SXT del (77,7%). Estos resultados fueron similares a estudios realizados por Marrero-Ortiz y col., en aislamientos de *Salmonella* spp. obtenidos desde ganado bovino, donde reportaron a las tetraciclinas y las sulfonamidas como los antimicrobianos ampliamente usados para el tratamiento de enteritis, infecciones respiratorias y mastitis; por lo cual, si esta bacteria está presente en el animal, recibe una cierta presión de selección con la posibilidad de desarrollo de resistencia (130).

Al contrario, de lo observado en los sistemas de producción bovino y equino, en los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados de aves, la serovariedad prevalente fue *S. Heidelberg* correspondiendo a un 55% (38/69) de los aislamientos analizados.

*S. Heidelberg* se encuentra entre los serovariedades más comúnmente detectados en aves de corral y está entre los cinco serotipos asociados con salmonelosis humana junto con *S. Typhimurium*, *Enteritidis*, *Newport* y I 4,[5], 12:i:- reportados en 2008 al CDC (Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/surveillance.html>) y al FDA (National Antimicrobial Resistance Monitoring System-Enteric), EUA; mientras que en Europa se posicionó en el noveno puesto y en América Latina, en la posición diecinueve de los serovariedades detectados con mayor frecuencia (131). Comparando a *S. Heidelberg* con otros serovariedades de *Salmonella* spp. causantes de gastroenteritis que por lo general causan una enfermedad leve y autolimitante, *S. Heidelberg* tiende a causar infecciones invasivas (132).

Si bien no ha sido reportado ningún brote alimentario que fuera responsable esta serovariedad, el INEI-ANLIS, reportó 119 cepas aisladas desde alimentos e informó el primer puesto para *S. Heidelberg* con el 38%, seguida de *S. Anatum* con 13%, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* con el 10% (121). *Salmonella* spp. pueden introducirse en establecimientos de aves comerciales, a partir de diferentes fuentes. Esta bacteria se puede transmitir de manera vertical hacia la progenie de parvadas de reproductoras infectadas o de manera horizontal dentro y entre las

parvadas (Comunicación personal, Dr. Dante Bueno), de ahí la importancia de determinar y caracterizar las serovariedades circulantes en un sistema de producción.

En los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados de bovinos y equinos, la sensibilidad a quinolonas fue de 10,5% (4/38) a NAL, 15,8% (6/38) a CIP y solo del 2,6% (1/38) a ENR; mientras que para esta misma bacteria pero en los aislamientos recuperados de aves la sensibilidad a quinolonas fue importante de 36,2% (25/69) a NAL; y a las fluoroquinolonas del 44,9% (31/69) a CIP y 59,4% (41/69) a ENR. Se ha sugerido que la alta frecuencia de resistencia a quinolonas en los aislamientos de *Salmonella* spp., se debe a la utilización frecuente de enrofloxacin y ácido nalidíxico con fines terapéuticos o metafilácticos (133).

En los aislamientos recuperados de bovinos y equinos, el análisis de la región QRDR arrojó mutaciones en GyrA (Ser83Phe y Asp87Asn), cambios que fueron anteriormente descrita en *Salmonella* spp. aislados de origen clínico (134), a estos cambios se puede atribuir el fenotipo de resistencia a NAL y a CIP. Sin embargo, *S. Enteritidis* 07/58-2, presento una mutación en Asp87Gli (D87G), esta sustitución nucleotídica es la más frecuente según estudios de Piddock *y col.*, en *Salmonellas* de origen veterinario (135). Esta mutación sería la responsable de la resistencia a NAL y valores de sensibilidad disminuida para CIP, que presenta dicho aislamiento, ya que estos aislamientos no mostraron determinantes PMQR. Una excepción es *S. Typhimurium* 11/085-6, con resistencia a NAL y sensibilidad disminuida a CIP, fue positiva a la PCR para *qnrB*; pero no contiene mutaciones en GyrA y ParC. Las mutaciones en parC de *Salmonella* spp. no son tan frecuentes como en *E. coli* y los estudios sugieren que no desempeñan un papel importante en la resistencia a las quinolonas o sólo pueden ser necesarios para lograr una resistencia de alto nivel, (135, 136) lo que ocurre con poca frecuencia entre los aislamientos de *Salmonella*.

En los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados de aves, no fue posible determinar la presencia de mutaciones en GyrA y ParC. En otros trabajos fueron reportadas mutaciones fuera de la región QRDR de *parC* el cambio Thr57Ser (T57S) fue observado en todos los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados

desde carne de pavo y además eran portadoras de determinantes PMQR, como *qnrS* y *qnrB* (137).

Muchos de los estudios de prevalencia determinantes PMQR realizados en el país, fueron realizados sobre enterobacterias de origen clínico (103, 134) y la mayoría de ellos enfocados en aislamientos con determinado fenotipo. En este trabajo de tesis, se estudió la presencia de determinantes de resistencia a quinolonas de origen plasmídico por primera vez, en aislamientos recuperados de animales de consumo en nuestra región.

En *S. Heidelberg* el determinante prevalente fue *qnrB* cuya proporción fue del 89,5% (34/38). Al analizar el resto de las serovariedades 16/31 (51,6%) mostraron el gen *qnrB*. La variante alélica detectada en todos los productores secuenciados fue *qnrB5*. Esta variante no había sido detectada en aislamientos clínicos de *Salmonella* spp. y en otras enterobacterias de nuestro país. El determinante de resistencia, *qnrB5* fue previamente descrito pero en *S. Berta* (137) en EE. UU, a partir de aislamientos de origen humano. En Sudamérica, *qnrB19* ha sido asociado como el único determinante responsable del fenotipo de resistencia a quinolonas en dos aislamientos de *S. Heidelberg*, aislado de carne de pollo cruda en Venezuela (138).

Se han descrito variantes alélicas como *qnrB19*, *qnrB10*, *qnrB2* y *qnrB1*, en aislamientos clínicos de diferentes provincias nuestro país, recuperados entre 2005-2008 (134). En este trabajo, se estudió una colección de enterobacterias clínicas que presentaban el fenotipo de sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas. En otro estudio diferente realizado en nuestro país, se investigó la prevalencia de los genes PMQR: *qnrB* de *qnrA*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *acc(6')-Ib-cr* y *qepA*, en aislamientos clínicos de enterobacterias resistentes a oximiinocefalosporinas, donde Rincón y col., reportó variantes alélicas de *qnrB* como *qnrB2*, *qnrB19*, *qnrB10*, *qnrB1* y *qnrB6* (103).

En todos los aislamientos de *Salmonella* analizados en este trabajo de tesis, no se detectó ningún otro determinante PMQR. Nuestro reporte es diferente a lo descrito por Veldman y col., que examinó aislamientos de *Salmonella* recuperados

no solo de animales, sino también de humanos, alimentos y el medio ambiente, e identificó con igual frecuencia las variantes *qnrS* y *qnrB*; mientras detectó en menor número *qnrA* y *aac (6)-Ib-cr* e identificó solo *qnrD* en aislamientos de *Salmonella* obtenidas de muestras de animales y humanos (139).

Un 29% (11/38) de los aislamientos de *S. Heidelberg* presentaron resistencia completa a NAL y CIP. Esta resistencia completa es poco frecuente según Whonet (93), pero al analizar el perfil de sensibilidad que presentan, se pueden inferir que poseen una combinación de mecanismos de resistencia, ya sea cromosómicos (mutaciones en *gyrA* y *parC*) y plasmídicos, como *qnrB*; ya que este determinante se observó en 10/11 de los aislamientos.

Al incorporar a los ensayos de difusión en discos el antimicrobiano pefloxacina (5 µg/ml), nos permitió diferenciar aquellos aislamientos que poseen sensibilidad disminuida a ciprofloxacina (con halos de inhibición para CIP  $\geq 31$ mm). Estos aislamientos 27/30 (90%) fueron resistentes a PEF (32, 140) y todos los aislamientos resistentes a PEF, amplificaron para el gen *qnrB*. El disco de NAL, por sí solo, no detecta el fenotipo de sensibilidad disminuida, mientras que mediante la incorporación del disco de pefloxacina, sugerido por Whonet (93) se identificaron correctamente todos los aislamientos con dicho fenotipo (141). Es probable que este determinante *qnrB* explique en parte, la sensibilidad disminuida (inusual) a CIP observada.

Entre las serovariedades de *S. enterica* recuperadas de aves, *S. Heidelberg* tuvo el mayor nivel de resistencia a los antimicrobianos mostrando un fenotipo de multirresistencia (MDR) de 3 a 9 familias diferentes de antimicrobianos ensayados. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en *Salmonella* spp. recuperados de granjas avícolas en Colombia (142), donde ninguno de los aislamientos fue sensible a todos los antimicrobianos ensayados y se observó una baja sensibilidad a fluoroquinolonas con niveles similares a los que se reportan en este trabajo de tesis.

Alrededor del 52 % de los aislamientos de *Salmonellas* spp. recuperados de aves, muestran sensibilidad a C3G. También se observó un bajo porcentaje de

sensibilidad a FOX y a CFT, cefalosporina usada frecuentemente en veterinaria. La resistencia a C3G en enterobacterias es frecuentemente mediada por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Desde su descripción, CTX-M-2 ha sido la BLEE prevalente en Argentina en humanos (143) y en menor proporción, otras BLEE como PER-2 y enzimas SHV (144, 145). A pesar de los años CTX-M-2 sigue siendo endémica, pero en un estudio multicéntrico realizado en el 2010, se observaron cambios en la epidemiología debido a la aparición de CTX-M-15 (en distintos linajes exitosos) y de la presencia de las enzimas de los grupos CTX-M-8 y CTX-M-9 (146). Las  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas como CMY-2 son el mecanismo de resistencia distinto de BLEE también presente en nuestro país, pero en un porcentaje mucho menor (99, 147).

En los 69 aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados de aves, se observó que el mecanismo prevalente de resistencia a C3G fue el anteriormente mencionado CMY-2 (19/69; 27,5%). Estas enzimas se encuentran distribuidos en diferentes serovariedades, como *S. Typhimurium* (n=1), *S. Oranienburg* (n=1), *S. Agona* (n=2) y especialmente en *S. Heidelberg* (n=15). Desde su caracterización CMY-2, ha sido identificada en un gran número de *Salmonella* spp. (*S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* (148), *S. Senftenberg*, *S. Agona*, *S. Heidelberg* (149, 150), *S. Oranienburg*) aisladas de humanos y animales de todas partes del mundo (15, 151). En nuestro país, no existen reportes de la presencia de esta enzima en *Salmonella* spp. recuperados de aislamientos de origen animal.

Analizando las enzimas responsables del fenotipo de resistencia a C3G en los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperadas de aves, se observó que la mayoría de los aislamientos (9/13) presentaron BLEE pertenecientes al grupo CTX-M-9, específicamente a CTX-M-14. CTX-M-14 fue detectada por primera vez en *S. Londres*, aislada desde 3 pacientes pediátricos hospitalizados con gastroenteritis en Korea (152). En Sudamérica, en el 2011 en un hospital en Uruguay se reportó por primera vez la enzima CTX-M-14 en *S. Enteritidis* aislada desde un paciente adulto (153). Los aislamientos de *Salmonella* anteriormente mencionados, al igual que los aislamientos de *S. Heidelberg* analizados en esta tesis, poseen un plásmido

cuyo grupo de incompatibilidad es IncI1 y posee un peso molecular de alrededor de 100 Kb.

Los plásmidos IncI1, son considerados uno de los cinco “plásmidos de resistencia epidémicos”, debido a su frecuente asociación con genes de BLEE y genes de tipo AmpC. De los 483 plásmidos que han sido depositados en la base de datos de pMLST (<http://pubmlst.org/plasmid/>), 295 de éstos pertenecen al grupo de incompatibilidad IncI1, se ha descrito que éstos plásmidos codifican diferentes genes de  $\beta$ -lactamasas; frecuentemente son identificados como parte del ST7 (secuenciotipo plasmídico 7) (85). Estos plásmidos han sido relacionados con la diseminación no solo de los genes que codifican para la BLEE CTX-M-14, sino también de otras  $\beta$ -lactamasas como: CMY-2, CTX-M-2, variantes alélicas del grupo CTX-M-9 y TEM-1; en aislamientos de diferentes serovariedades de *Salmonella* spp. y en *E. coli*, tanto desde fuentes humanas como animales (bovinos, cerdos, equinos, perros, pollos, etc)(128, 154). Un estudio efectuado en Holanda comprobó la transferencia de éstos plásmidos entre cepas recuperadas de animales productores de alimentos y otras aisladas de seres humanos (155). Estos aislamientos de *E. coli* recuperados desde muestras de carne de aves de corral, portaban plásmidos IncI1 acarreando genes BLEE. Por lo cual, el transporte intestinal de bacterias productoras de BLEE en animales productores de alimentos y la posterior contaminación de la carne al por menor, podría contribuir al aumento de la incidencia de infecciones con bacterias productoras de BLEE en seres humanos.

En este trabajo de tesis se describe por primera vez la detección de CMY-2 en un aislamiento de *S. Typhimurium* de origen animal en la Argentina (156), este aislamiento corresponde al primer grupo de aislamientos analizados que fue recuperado de un equino. Al caracterizar la plataforma donde se encuentra el gen de resistencia y secuenciar el plásmido pST10-16 se observaron diferencias en el entorno de CMY-2 al compararlo con los aislamientos de origen animal (y humanos) portadores de CMY-2 previamente descritos en Argentina e incluso en otros países (157, 158). Esto se confirmó posteriormente por medio de la secuenciación del plásmido, pST10-16.

La secuencia de inserción *ISEcp1*, *upstream* de *bla<sub>CMY-2</sub>*, se encontró truncada por otra secuencia de inserción *IS1294* (159). Este segmento *IS1294b-ΔISEcp1-bla<sub>CMY-2</sub>* muestra un 99% de identidad nucleotídica con el contexto genético de *bla<sub>CMY-2</sub>* identificado en los plásmidos pTN38148 (Genbank n° de acceso FM246883.1) y pR7AC (Genbank n° de acceso KF434766), ambos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncI1 aislados desde *E. coli*. Rearreglos similares fueron encontrados en un aislamiento de *E. coli* recuperado de un equino portador de un plásmido, pEQ011, (Genbank n° de acceso KF582523); sin embargo, el grupo de incompatibilidad de éste plásmido es IncFII. Desde nuestro conocimiento, el arreglo encontrado *upstream* de *bla<sub>CMY-2</sub>* en pST10-16 no ha sido previamente descrito en *Salmonella* spp.

*Downstream* a *bla<sub>CMY-2</sub>* se encuentra flaqueado por los genes *blc*, *sugE* y *ecnR*, siendo este arreglo previamente descrito por Cejas y col (99) en enterobacterias de origen clínico en Argentina. El arreglo genético y el mecanismo por el cual esta estructura se traspone se denomina en inglés “*one-ended transposition*”, ha sido recientemente descrito en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* (160). Esto sugiere que *bla<sub>CMY-2</sub>* podría ser diseminado mediante eventos de transposición entre diferentes replicones o por transferencia horizontal de elementos extra cromosomales entre distintos aislamientos.

La resistencia a C3G, ya fue descrita en aislamientos de *S. Heidelberg*, pero se sabía muy poco sobre los aislamientos de *Salmonella* recuperados de granjas de engorde, en Argentina, hasta el momento de realización de este trabajo

Cada una de las cepa analizadas en este estudio de *Salmonella* spp. recuperadas de aves, pertenecen a una granja diferente (Comunicación oficial, SENASA). La resistencia a C3G fue el fenotipo prevalente. El total de los aislamientos analizados en este estudio por PFGE, son agrupados en 4 patrones de bandas diferentes (ARJF6X01.0025, ARJF6X01.0026, ARJF6X01.0027 y ARJF6X01.0028). El patrón que se obtuvo con mayor frecuencia fue el ARJF6X01.0025 en 16/20 (80%) aislamientos; este patrón englobó a la mayoría de los aislamientos de *S. Heidelberg* analizados, esto demuestra la clonalidad entre los aislamientos. Generalmente se observa que para una serovariedad determinada, todos los aislamientos de una

misma granja, tienden a agruparse, lo que sugiere su estrecha relación genética. Sin embargo, en nuestro estudio se observó una estrecha similitud genética para los aislamientos recuperados de diferentes granjas, similar a lo reportado en aislamientos de *Salmonella* en diferentes granjas de Brasil por Fitch *et al.* (161), lo que indica el potencial de propagación que posee este clon resistente.

Los perfiles de resistencia de los aislamientos seleccionados y analizados por PFGE difieren, ya que presentan mecanismos de resistencia a C3G diferentes como CTX-M-2, CTX-M-14 o CMY-2 e inclusive presencia o ausencia del determinante *qnrB5*; pero según el patrón ARJF6X01.0025, cada uno de los aislamientos o grupos de aislamientos, estarían genéticamente relacionados, inclusive con el único aislamiento sensible a C3G como *S. Heidelberg* N°5B. Es interesante destacar que más allá del determinante de resistencia presente, el plásmido fue siempre clasificado como grupo de incompatibilidad IncI1 y en todos ellos fue descrito el mismo sistema toxina-antitoxina, *pndA-C*, razón por la cual se considera que hay un esqueleto plasmídico central que se mantendría constante y que la región que contiene el determinante de resistencia poseería una dinámica menos estable. La presencia de este sistema de adicción fue reportado por Cordeiro *et al.*, pero en aislamientos de *S. Typhimurium* de origen clínico en Uruguay (157). En dos aislamientos de *S. Heidelberg* se detectó además del sistema TA anteriormente descrito, el sistema *ccdA-B*. Este sistema TA, involucrado en la estabilidad del plásmido, presenta una distribución más diversa y fue detectado en las serovariedades de *Salmonella* más difundidas, como *S. Typhimurium* (162, 163). La razón por la cual existe una alta prevalencia de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en dichos aislamientos de *S. enterica*, necesitaría ser determinada.

Posiblemente podemos referirnos a un fenómeno de dispersión clonal sumando a una facilidad en la diseminación y el reclutamiento de marcadores de resistencia (como es el caso de CMY-2); ya que éstas muestras clonalmente relacionadas fueron aisladas de dos provincias diferentes y separadas por varios kilómetros de distancia una granja de otra, en la mayoría de los casos. Un fenómeno similar fue descrito en 2009 por Fernandes *et al.*, (164) quienes reportaron 10 aislamientos de *S. Typhimurium* productores de CTX-M-2, genéticamente relacionados y

obtenidos de fuentes humanas y de aves de corral en dos ciudades distantes de Brasil. En 2013, el CDC informó sobre un brote de *S. Typhimurium* distribuido a través de 39 estados, en Estados Unidos (120) y que estuvieron clonalmente relacionados.

Este evento fue descrito en un estudio recientemente realizado en Brasil, donde se estableció la relación clonal de aislamientos pertenecientes a instalaciones productoras de pollos de dos regiones geográficas diferentes, lo que indicó la propagación clonal de *bla*<sub>CTX-M-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14</sub> en *Salmonella* spp. (161). Según Carattoli y col., una posible explicación a este fenómeno es que marcadores de resistencia se encuentren ampliamente diseminados, es que durante la cría de los pollos de engorde, el alimento y otros productos usados en la producción son intercambiados a través de las diferentes granjas pertenecientes a una misma integración (debido a la forma de manejo del integrado), lo que trae aparejado la posibilidad de dispersión de estas cepas con la consecuente transferencia de los elementos genéticos móviles presentes (85).

No fue posible asociar la capacidad de algunos de éstos aislamientos de producir algún brote; pero teniendo en cuenta que presentan el mismo patrón ARJF6X01.0025, que fue responsable de infecciones específicas registradas en la Base de Datos Nacional de nuestro país; estos resultados ponen en relieve el tiempo que este clon lleva circulando en nuestro país y la importancia de controlar los genotipos de *S. enterica* aislados de las diferentes fuentes (granjas, muestras clínicas y de alimentos) con el objetivo de poder desarrollar estrategias adecuadas para un control efectivo y mejorar con ello la producción de alimentos de una manera más segura para evitar la aparición de ETAs a causa de este patógeno.

Nuestros resultados indican que los aislamientos de *Salmonella* spp. podrían actuar como posibles reservorios para BLEE. Además, se suma el riesgo potencial de transmisión zoonótica o el de transmisión por los alimentos, lo cual pone de relieve la necesidad de implementar estrategias basadas en buenas políticas de higiene en la manipulación de alimentos y la necesidad de aplicar normas y leyes destinadas a controlar la calidad de los alimentos ofrecidos al público en general.



## Capítulo II:

### Consideraciones generales *E. coli*

*E. coli* es un bacilo gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobio facultativo, móvil e inmóvil por medio de flagelos peritricos, que coloniza el intestino de los animales de sangre caliente, formando parte de la microbiota normal. Es una bacteria de localización ubicua, ya que es eliminada al medio ambiente en la materia fecal y puede sobrevivir un tiempo limitado.

*E. coli* es muy versátil, se adapta fácilmente a las características del hábitat y puede crecer en un medio con glucosa como única fuente orgánica. También puede crecer en ausencia de oxígeno y bajo estas condiciones puede proliferar por fermentación, produciendo ácidos y gas como productos finales. También es viable su crecimiento mediante respiración anaeróbica ya que es capaz de utilizar  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  o fumarato, como aceptores finales de electrones. Esta habilidad le permite adaptarse al hábitat intestinal (anaeróbico) y extraintestinal (aeróbico o anaeróbico).

Los aislamientos de *E. coli* se diferencian serológicamente por los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (K). Se han identificado más de 174 antígenos O, 56 antígenos H y 80 K, con más de 700 serotipos (basados en diferentes combinaciones de los antígenos O, H y K).

*E. coli* es un patógeno entérico importante especialmente en países en vía de desarrollo y se ubica entre los primeros lugares entre los patógenos nosocomiales. Si las cepas no poseen genes que codifican para factores de virulencia son consideradas comensales; pero si adquieren esos factores por algún mecanismo de transferencia horizontal de material genético, son patógenas y producen diferentes tipos de infecciones que pueden causar entre otros síntomas diarrea.

Se ha propuesto un esquema de clasificación para *E. coli*, basado en la presencia de factores de virulencia como adhesión, efecto de dicha adhesión en las células huésped, producción de toxinas y/o invasividad (165).

Hasta el momento se conocen 6 clases o patotipos de *E. coli*, asociados con infecciones entéricas: *E. coli* Enteropatógeno (EPEC), *E. coli* Enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* Enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* Enteroadherentes (EaggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (166).

### *Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC)*

Es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos, asociados a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH).

En Argentina, *E. coli* O157:H7 y otros serotipos productores de Stx son causantes de SUH. El SUH es endémico en algunos países de América Latina y la notificación sólo es obligatoria en la Argentina, Chile, Bolivia y Paraguay. SUH representa la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños y la segunda causa de insuficiencia renal crónica, con más del 70% de estos casos asociados con infección por *E. coli* O157:H7 (167).

*E. coli* O157:H7, es el representante principal de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico. Las cepas STEC asociadas a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Producen una toxina citotóxica denominada toxina Shiga (Stx), responsables del daño del endotelio vascular sistémico. Las cepas pueden producir Stx1, Stx2 y variantes de Stx2, solas o en combinación de las dos toxinas. Otros factores de virulencia que pueden estar presentes en forma simultánea son la enterohemolisina y la intimina. La intimina, codificada por el gen cromosómico *eae*, es responsable de la unión íntima de STEC a células epiteliales intestinales, causando lesiones de adherencia y borrado en la mucosa intestinal (168).

Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, se describieron como los principales reservorios de STEC. En nuestro país, se han realizado numerosos estudios sobre la prevalencia de STEC que permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio (169). Sin embargo, la aparición esporádica de SUH se atribuye al aumento de la frecuencia de los serotipos no-O157 de STEC. Tanto la fauna silvestre y los animales domésticos también son huéspedes naturales de STEC y la mayoría de ellos se comportan como huéspedes asintomáticos (170).

La vía de transmisión principal de *E. coli* STEC O157 y no-O157 son los alimentos contaminados como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o mal cocidos, embutidos fermentados, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa,

papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, entre otros. Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral, y la contaminación fecal de aguas de recreación o aguas de pozo. Es importante destacar que la dosis efectiva para ocasionar enfermedad muy baja y es suficiente con 10 a 100 bacterias por gramo de alimento.

## Procedencia de los aislamientos

### Aislamientos bacterianos III: *E. coli* recuperadas de bovinos

El objetivo de esta sección de la tesis, fue caracterizar el patrón de resistencia y de virulencia de aislamientos STEC no-O157 obtenidos a partir de terneros con diarrea de varios establecimientos productores de ganado de la provincia de Buenos Aires. Esta caracterización nos permitirá brindar un aporte epidemiológico para ampliar lo que se conoce de la situación actual de nuestro país acerca de una de las principales fuentes de STEC no-O157.

Se analizaron aislamientos de *E. coli* productora de la toxina-Shiga (STEC), obtenidos entre 1997-2010 a partir de materia fecal de terneros diarreicos.

### Aislamientos bacterianos IV: *E. coli* recuperadas de aves

En una segunda etapa se analizaron 41 aislamientos de *E. coli* presentes en animales asintomáticos. Estos aislamientos fueron obtenidos durante el año 2014, desde muestras de materia fecal de pollos parrilleros de 4 a 6 semanas de edad. Estas muestras pertenecen a 11 granjas comerciales diferentes, pertenecientes a 3 compañías de integrados diferentes que abarcan gran parte del área de producción, principalmente localizados entre las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires.

Los aislamientos se recuperaron a partir de material fecal, empleando como medio selectivo agar McConkey e incubando 18-24 horas a 37°C. Las colonias lactosa positivas fueron seleccionadas y se realizaron las pruebas bioquímicas convencionales para confirmar la especie.

# Resultados

## Aislamientos bacterianos III

Se analizaron 63 aislamientos de *E. coli* productores de la toxina-Shiga STEC-no 0157. Dentro de los aislamientos STEC, los serotipos prevalentes fueron O26, [O26:H11 (n=21) y O26: H- (n=2)] y el O111 [O111: H- (n=16), O111: H21 (n=1)], el resto de los aislamientos presentan varios serotipos como O5: H-, O119:H-, O123: H- (Tabla 31).

**Tabla 31:** Aislamientos de *E. coli* STEC-no 0157 recuperados de bovinos agrupados de acuerdo al serotipo que presentan

Serotipo	Protocolo	Año	Serotipo	Protocolo	Año	Serotipo	Protocolo	Año
<b>O26:H11</b>	97/12 A	1997	<b>O111:H-</b>	98/299-2	1998	<b>O101:H9</b>	09/562-60	2009
	97/23 A	1997		01/107-28	2001	<b>O159:H4</b>	98/345-12	1998
	98/345-11	1998		01/289-1	2001	<b>O9:H16</b>	07/169-2	2007
	98/345-19	1998		01/289-18	2001	<b>ONT:H25</b>	01/246-36	2001
	05/191-28	2005		01/280-1	2001	<b>ONT:H8</b>	01/179-13	2001
	05/194-10	2005		05/221-5	2005	<b>OR:H-</b>	97/16 A	1997
	09/224-1	2009		08/23-3	2008	<b>ONT:HNT*</b>	98/345-3	1998
	09/224-2	2009		08/23-5	2008		07/169-1	2007
	09/224-4	2009		08/23-23	2008		08/23-19	2008
	09/224-5	2009		08/23-24	2008		08/344-3	2008
	09/224-6	2009		08/311-19	2008		08/344-10	2008
	09/224-14	2009		09/282-7	2009		09/197-13	2009
	09/224-16	2009		09/282-8	2009		09/197-14	2009
	09/224-25	2009		09/282-9	2009		09/282-12	2009
	09/224-27	2009		09/282-10	2009		09/562-36	2009
	09/224-29	2009		10/33-65	2010		09/634-5269	2009
	09/224-63	2009	<b>O111:H21</b>	08/412-5	2008	10/33-74	2010	
	09/224-64	2009	<b>O5:H-</b>	98/345-7	1998			
	09/224-65	2009		98/363-30	1998			
	09/224-66	2009		01/179-26	2001			
09/224-67	2009	<b>O119:H-</b>	08/344-11	2008				
<b>O26:H-</b>	98/345-18	1998	<b>O123:H38</b>	99/178-18	1999			
	10/276-5	2010	<b>O153:H28</b>	98/345-23	1998			

\*no se pudo determinar el serotipo, negativos a todos los antisueros probados.

Estos aislamientos fueron seleccionados por poseer como marcadores de virulencia los genes codificando para las toxinas Stx<sub>1</sub>, Sxt<sub>2</sub>.

El 87% (55/63) de los aislamientos STEC, presentaron sólo el gen *stx1*, mientras que 5/63 sólo el gen *stx2*. Tres aislamientos (*E. coli* 01/289-1, *E. coli* 05/191-28 y *E. coli* 09/178-18); codifican tanto para Stx1 como Stx2 (Tabla 32).

### Factores de virulencia

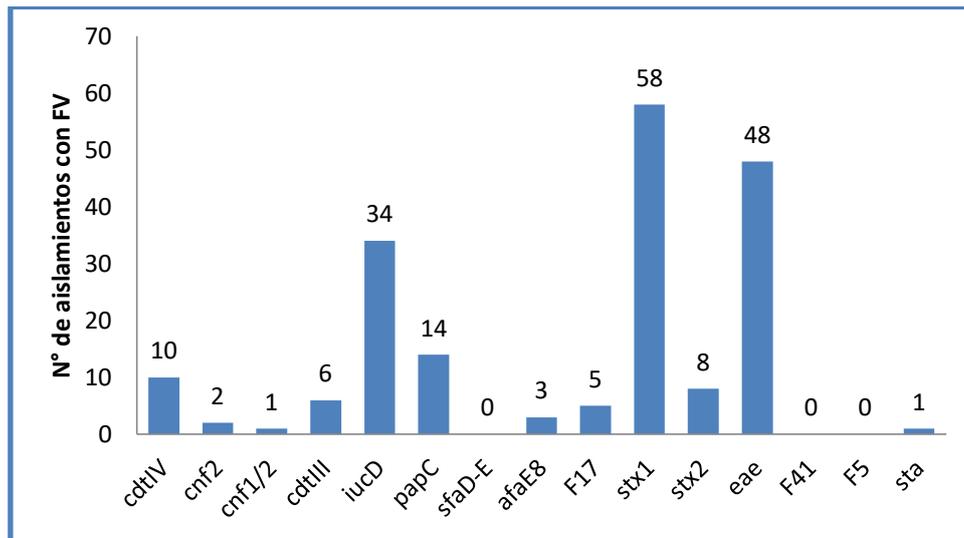
Los aislamientos STEC positivos (51/63) fueron sometidos a un ensayo adicional en donde se investigó la presencia de genes que codifican toxinas (STa, CDTII, CDT IV, CNF1 y CNF2), las adhesinas (F41, F5, Afa-8, F17 y S) y la aerobactina de sideróforos (*iucD*) (Tabla 32 y Figura 28).

Algunos de los aislamientos incluidos en este trabajo de tesis, ya poseían el patrón de virulencia ya determinado (171), entre ellos: *E. coli* 97/12 A, 97/16 A, 97/23 A, 98/345-7, 9, 11, 12, 18, 19, 23, 30 y 99/178-18. Fueron seleccionados igualmente, para caracterizar su perfil de resistencia y así completar la caracterización.

Los genes de los factores de virulencia fueron determinados mediante PCR, usando *primers* específicos (detallados en Materiales y Métodos) y empleando como templado ADN total extraído mediante lisis.

**Tabla 32:** Perfil de virulencia obtenidos en los aislamientos de *E. coli* STEC no-0157

05/191-28	stx1	stx2	eae	iucD	cdtIV	papC	
99/178-18	stx1	stx2	eae	iucD	afaE8	Sta	
01/289-1	stx1	stx2	eae	iucD	papC		
98/345-12	stx1	eae	iucD	papC	F17	cdtIII	
01/289-18	stx1	eae	iucD	cdtIV	papC		
98/345-23	stx1	eae	iucD	cdtIV	F17		
01/179-26	stx1	eae	iucD	cdtIV			
97/23, 05/194-10	stx2	eae	iucD	cdtIV	cdtIII		
98/299-2, 07/169-1, 09/197-13	stx1	eae	iucD	papC			
07/169-2	stx1	eae	cdtIV	papC			
98/345-19, 01/179-13, 05/221-5, 08/23-3, 08/23-5, 08/23-23, 08/311-19, 09/197-14, 09/224-63, 09/224-64, 09/224-65, 09/224-66, 09/224-67, 10/33-65	stx1	eae	iucD				
09/224-14, 09/224-16	stx1	eae	cdtIV				
09/224-29	stx1	eae	F17				
98/345-7, 01/107-28, 08/23-24, 09/224-1, 09/224-2, 09/224-4, 09/224-5, 09/224-6, 09/224-25, 09/224-27, 09/282-7, 09/282-8, 09/282-9, 09/282-10, 09/282-12	stx1	eae					
97/12 A, 98/345-11, 10/276-5	stx2	eae					
08/23-19	stx1	iucD	cdtIV	papC			
09/562-36	stx1	iucD	papC	F17			
08/344-10	stx1	iucD	papC	cdtIII			
08/344-11	stx1	iucD	papC	cdtIII	cnf1/2		
98/345-3	stx1	iucD	F17				
97/16 A, 01/280-1, 08/412-5, 09/562-60	stx1	iucD					
08/344-3	stx1	papC					
09/634-5269	stx1	papC	afaE8				
01/246-36	stx1	cdtIII					
10/33-74	stx1	afaE8					
98/345-18, 98/363-30	stx1						



**Figura 28:** Proporción de factores de virulencia (FV) presentes en los aislamientos de *E. coli* analizados determinados mediante PCR. **CdtIV:** toxina distensora citoletal IV (*Cytolethal distending toxin IV*), **CnflI:** factor II necrotizante citotóxico (*Cytotoxic necrotizing factor II*), **CnflI:** factor I necrotizante citotóxico (*Cytotoxic necrotizing factor I*), **CdtIII:** toxina distensora citoletal III (*Cytolethal distending toxin III*), **iuc:** aerobactina (*Aerobactin*), **pap:** pili asociado con pielonefritis (*pili associated with pyelonephritis*), **Sfa:** adhesina Fimbrial S (*S-fimbrial adhesin*), **afa:** adhesinas afimbriales (*Afimbrial adhesin VIII*), **F17:** fimbria 17 (fimbrial 17), **stx1:** toxina shiga I (*Shiga toxin I*), **stx2:** toxina shiga II (*Shiga toxin II*), **eae:** intimina (*Intimin*), **F41:** fimbria 41 (*Fimbrial 41*), **F5:** fimbria 5 (Fimbrial 5), **Sta:** enterotoxina termoestable (*Heat-stable enterotoxin*).

El 87% de los aislamientos productores de toxina shiga analizados solo contiene el determinante de virulencia *stx1* (55/63) y es acompañado por el gen de intimina, *eae*, en 63,5% (40/63) de los aislamientos. En los aislamientos sólo con el determinante de virulencia *stx2* fue acompañado por *eae* (5/63), mientras que para la combinación de ambos genes de virulencia, *stx1+ stx2+eae* (3/63).

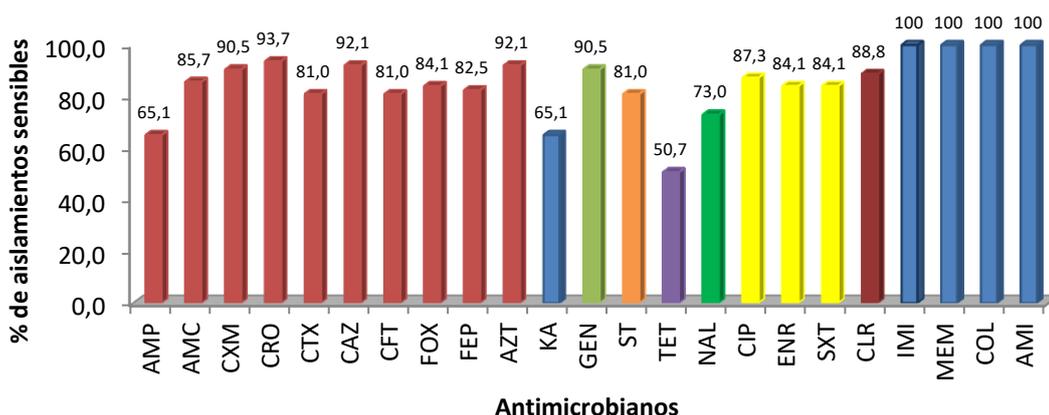
Otros de los factores de virulencia detectados con mayor frecuencia fueron *iucD* en un 49,3% de los aislamientos (34/69), *papC* en solo un 20,3% (14/69) y *cdtIV* en un 14,5 % (10/69) de todos los *E. coli* analizados (Figura 28).

El patrón de virulencia que predomina en el 24% (15/63) aislamientos es el representado por los genes de virulencia por *stx1-iucD*, seguido del patrón *stx1-eae-iucD* en el 20,3% (14/69) de los aislamientos de *E. coli* STEC analizados (Tabla 32).

## Sensibilidad antibiótica

A estos aislamientos se estudió el perfil de sensibilidad el cual se resume en la figura 29. Se observa un porcentaje de sensibilidad a AMP del 65,1% (41/63), mientras que para las C3G como CTX y CFT fue del 81% (51/63). El porcentaje de sensibilidad más bajo, se obtuvo para TET 50,7 % (32/63). El porcentaje de sensibilidad a aminoglucósidos KA y GEN, fue 63,5% (41/63) y 90,5% (57/63).

Con respecto a las quinolonas, los porcentajes de sensibilidad fueron: NAL 73% (46/63, ENR 84,1% (53/69) y CIP 87,3% (55/63). Ninguno de los aislamientos mostró resistencia o sensibilidad disminuida a los carbapenemes IMI y MER. Tampoco hubo aislamientos resistentes a COL. Por otra parte, solo 5/63 aislamientos mostraron resistencia a 4-6 familias distintas de ATM.



**Figura 29:** Sensibilidad a antimicrobianos de 63 aislamientos de bovinos en *E. coli* STEC obtenidos entre 1997-2010. Antimicrobianos ensayados: **AMP:** ampicilina, **AMC:** amoxicilina-ác. clavulánico, **CXM:** cefuroxima, **CRO:** ceftriaxona, **CTX:** cefotaxima, **CAZ:** ceftazidima, **CFT:** ceftiofur, **FOX:** cefoxitina, **FEP:** cefepime, **AZT:** aztreonam, **KA:** kanamicina, **GEN:** gentamicina, **ST:** estreptomicina, **TET:** tetraciclina, **NAL:** ác. nalidíxico, **CIP:** ciprofloxacina, **ENR:** enrofloxacina, **SXT:** trimetoprima-sulfametoxazol, **CLR:** cloranfenicol, **IMI:** imipenem, **MEM:** meropenem, **COL:** colistina y **AMI:** amicacina.

Del total de cepas ensayadas, es importante destacar que 58/63 aislamientos resultaron resistentes al menos a una de las C3G ensayadas (CAZ, FOX y AZT) y que dos aislamientos, designados como *E. coli* 01/246-36 y 09/562-60 mostraron

resistencia a todas las oximiino-cefalosporinas. Solo *E. coli* 09/562-60, presentó resistencia a las quinolonas (NAL, CIP y ENR) y a otros antibióticos como KA, SXT, TET y CLR.

### Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas

En los aislamientos de *E. coli* STEC, *bla*<sub>TEM</sub> fue identificado en 18 aislamientos resistentes a AMP (26%). El amplicón de 1080 bp fue secuenciado directamente, y en todos los casos la secuencia codificante mostró 100% de identidad con la  $\beta$ -lactamasa, TEM-1.

Los aislamientos designados como *E. coli* 01/246-36 y 09/562-60 mostraron resistencia a C3G, por lo cual se realizó la detección de la presencia de  $\beta$ -lactamasa tipo AmpC empleando BOR y ácido clavulánico, para BLEE. La sinergia con BOR resultó positiva, lo cual permite sospechar la posible producción de cefalosporinasa, AmpC (Tabla 33).

**Tabla 33:** Tamizaje fenotípico en *E. coli* resistentes a C3G recuperadas de bovinos

Aislamiento s	FOX	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/CLA	CAZ/CLA	Aumento $\geq$ 5 mm	Efecto con BOR	$\beta$ -lactamasa
<i>E. coli</i> 01/246-36	R	S	R	1 7	1 7	19	20	Ausente	POSITIVO, CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC
<i>E. coli</i> 09/562-60	R	S	R	1 8	1 6	19	20	Ausente	POSITIVO, CTX/BOR y CAZ/BOR	AmpC

Mediante PCR *multiplex* se logró amplificar en ambas muestras el fragmento de 462 bp perteneciente al *cluster* CIT y posteriormente se amplificó el gen completo de *bla*<sub>CMY</sub>. La posterior comparación de la secuencia nucleotídica en la base de datos, determinó que ambas secuencias pertenecen a la variante alélica de CMY-2 (100% de identidad nucleotídica).

### Determinación de las mutaciones presentes en la región QRDR en *E. coli*

El análisis de las mutaciones presentes en la región QRDR se llevó a cabo en todos los aislamientos de *E. coli* resistentes a NAL (17/63) recuperadas de bovinos.

A diferencia de lo observado para *Salmonella* spp. recuperadas de bovinos, se encontró que en aislamientos *E. coli* fueron necesarias al menos dos sustituciones en GyrA, para mostrar elevados niveles de resistencia a FQ. En la mayoría de los aislamientos, que presentan sustituciones nucleotídicas en el codón Ser83 presentan un alto nivel de resistencia a NAL (CIM  $\geq 256$  ug/ml); el residuo de Ser es sustituido por Leu (Ser83Leu), esto fue observado en 13/17 aislamientos. Sólo uno de los aislamientos posee un cambio diferente Ser83Cys en vez de Leu.

Cuando se observaron mutaciones adicionales en el codón 87 para GyrA, dichas aislamientos ampliaron el perfil de resistencia a FQ (CIP, 3/5 aislamientos resistentes). Estas mutaciones se resumen en la Tabla 34.

**Tabla 34:** Sustituciones aminoacídicas en la región QRDR en *E. coli* bovinos

Aislamientos	Test de difusión			CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )			Sustituciones aminoacídicas en:					PMQR
	NA L	CIP	EN R	NAL	CIP	ENR	GyrA			ParC		
<i>E. coli</i> K12	S	S	S	.....	.....	.....	Ser 83	Asp 87	Ala67	Ser 80	Glu 84	
<i>E. coli</i> 01/179-13	R	I	I	$\geq 25$ 6 (R)	1 (S)	1 (I)	Leu	.....	.....	.....	.....	<i>qnrA</i>
<i>E. coli</i> 01/289-1	R	I	I	$\geq 25$ 6 (R)	$\geq 25$ 6 (R)	1 (I)	Leu	.....	Asp	.....	.....	
<i>E. coli</i> 01/289-18	R	S	S	$\geq 25$ 6 (R)	1 (S)	0.5 (S)	Leu	.....	.....	.....	.....	
<i>E. coli</i> 01/280-1	R	R	R	$\geq 25$ 6 (R)	$\geq 25$ 6 (R)	4 (R)	Leu	Asn	.....	Ile	Gly	<i>qnrA</i>
<i>E. coli</i> 05/221-5	R	S	S	128 (R)	0.5 (S)	0.25 (S)	Leu	.....	.....	.....	.....	
<i>E. coli</i> 07/169-1	R	I	S	128 (R)	1 (S)	0.5 (S)	Leu	.....	.....	.....	.....	
<i>E. coli</i> 08/23-3	R	S	I	128 (R)	0.5 (S)	0.25 (S)	Leu	.....	.....	.....	.....	
<i>E. coli</i> 08/23-5	R	S	S	$\geq 25$ 6 (R)	0.5 (S)	0.12 (S)	.....	.....	.....	.....	.....	
<i>E. coli</i> 08/23-19	R	S	I	$\geq 25$ 6 (R)	0.5 (S)	1 (I)	Cys	.....	His	.....	.....	
<i>E. coli</i> 08/23-23	R	S	I	128 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)	Leu	Thr	.....	.....	.....	
<i>E. coli</i> 08/23-24	R	S	I	128 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)	Leu	.....	.....	.....	.....	
<i>E. coli</i> 09/197-14	R	I	S	$\geq 25$ 6 (R)	64 (R)	0.5 (S)	Leu	.....	.....	.....	.....	<i>qnrA</i> , <i>B y S</i>
<i>E. coli</i>	R	S	S	$\geq 25$	0.5	0.12	.....	.....	.....	.....	.....	

09/224-5				6 (R)	(S)	5 (S)							
<i>E. coli</i> 09/562-60	R	R	R	≥25 6 (R)	128 (R)	64 (R)	Leu	Asn	.....	Ile	.....	<i>qnrA</i>	
<i>E. coli</i> 09/634- 5269	R	R	R	32 (R)	256 (R)	64 (R)	Leu	Tyr	Pro	Ile	.....	<i>qnrA</i>	
<i>E. coli</i> 10/33-65	R	I	I	≥25 6 (R)	1 (S)	1 (I)	Leu	.....	.....	.....	.....	<i>qnrA</i>	
<i>E. coli</i> 10/33-74	R	S	S	32 (R)	0.5 (S)	1 (I)	.....	.....	.....	.....	.....		

Se evidenciaron también sustituciones aminoacídicas en posiciones detectadas con menor frecuencia tales como Ala67 y Gln106. El cambio en Ala67, se observó en 3 aislamientos (mutación comúnmente reportada es el cambio por Ser), pero estos aislamientos presentan cambios por Asp, His y Pro. Estos 3 aislamientos presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a las FQ, ya sea CIP o a ENR, determinado por difusión con discos o CIM.

También se observaron mutaciones en ParC, en la posición Ser80 y los cambios por Arg o Ile, en esa posición, son los más frecuentes. En estos aislamientos se observaron 3/17 con la sustitución por Ser80Ile. Estos aislamientos poseen a su vez dos mutaciones en GyrA.

Otros cambios observados en ParC, ocurrieron en la posición Glu84 y las sustituciones más comunes fueron por Gly, Lys y Val. Solo un aislamiento (*E. coli* 01/280-1) presentó la sustitución por Glu84Gly, éste posee dos sustituciones dos en GyrA y dos en ParC.

### Detección de genes PMQR

La caracterización molecular de los determinantes PMQR se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, la enzima acetiltransferasa *aac (6')-Ib-cr* y las bombas de eflujo *qepA* y *oqxAB*.

Dentro de los aislamientos de *E. coli* que presentaron de fenotipo de resistencia a todas las fluoroquinolonas ensayadas tanto a NAL, CIP y ENR (*E. coli* 01/280-1,

09/562-60 y 09/634-5269), además de poseer más de una mutación en la región QRDR (tanto en GyrA como ParC), dieron positivas para el determinante *qnrA*.

Aquellos aislamientos que mostraron resistencia a NAL, sensibilidad disminuida a CIP y ENR y con solo una mutación en GyrA (n=3), 3 aislamientos presentaron el gen *qnrA* (*E. coli* 01/179-13, 09/197-14, 10/33-65). Sólo un aislamiento *E. coli* 09/197-14 dio positivo para *qnrS* y *qnrB*. Todos estos aislamientos fueron resistentes a PEF.

Ninguno de los aislamientos resultaron positivos a *qnrC*, *qnrD*, variante de la acetiltransferasa *aac(6')-Ib-cr* y los que codifican para las bombas de eflujo *qepA* y *oqxAB*.

## Aislamientos bacterianos IV

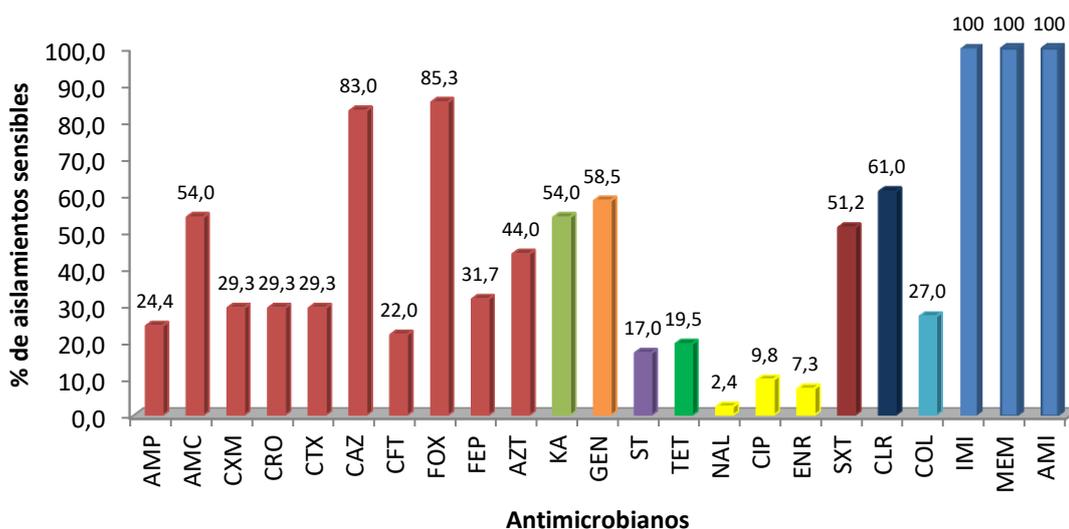
### Sensibilidad antibiótica

Se analizaron 41 aislamientos de *E. coli* (EC), obtenidos de diferentes granjas de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos y Buenos Aires. En este sistema de producción se observó un gran porcentaje de resistencia a los ATM  $\beta$ -lactámicos ensayados. El análisis de sensibilidad antimicrobiana, mostró un porcentaje muy bajo de sensibilidad a penicilinas y cefalosporinas de tercera generación [AMP de 24,4 % (10/41) y CXM, CTX, CRO del 29,3 % (12/41)]. También, se obtuvo un bajo porcentaje de sensibilidad para CFT de 22% (9/41) y para FEP del 31,7% (13/41). Como resultado llamativo, se destaca el mayor porcentaje de sensibilidad a CAZ [83% (34/41)] y para FOX [85,3% (35/41)].

En la mayoría de los aislamientos bajo estudio el porcentaje de sensibilidad a quinolonas fue muy bajo, con valores de 2,4 % para NAL (1/41), 7,3 % para ENR (3/41) y de 9,8 % a CIP (4/41).

El porcentaje de sensibilidad a aminoglucósidos KA y GEN, fue 54% (23/41) y 58,5 % (24/41) respectivamente. La sensibilidad a SXT fue de 51,2% (21/41), mientras

que la sensibilidad a TET fue del 19,5% (8/41) y a ST del 17% (7/41). Todos los aislamientos fueron sensibles al aminoglicósido AMI y a los carbapenemes IMI y MEM. Al contrario de lo observado con los aislamientos de *E. coli* obtenidos de bovinos, se observó un porcentaje de sensibilidad a COL de solo 27% (11/41) (Figura 30).



**Figura 30:** Las barras representan el porcentaje de sensibilidad de los aislamientos de aves en *E. coli* a los antibióticos probados. Antimicrobianos ensayados: **AMP:** ampicilina, **AMC:** amoxicilina-ác. clavulánico, **CXM:** cefuroxima, **CRO:** ceftriaxona, **CTX:** cefotaxima, **CAZ:** ceftazidima, **CFT:** ceftiofur, **FOX:** cefoxitina, **FEP:** cefepime, **AZT:** aztreonam, **KA:** kanamicina, **GEN:** gentamicina, **ST:** estreptomicina, **TET:** tetraciclina, **NAL:** ácido nalidíxico, **CIP:** ciprofloxacina, **ENR:** enrofloxacina, **SXT:** trimetoprima-sulfametoxazol, **CLR:** cloranfenicol, **COL:** colistina, **IMI:** imipenem, **MEM:** meropenem y **AMI:** amicacina.

Al contrario de lo observado en los aislamientos de *Salmonella* de pollos de engorde, en el total de aislamientos de *E. coli* analizados, no se observaron aislamientos totalmente sensibles a los antibióticos ensayados (Tabla 35). Solo dos aislamientos *E. coli* 241-S3 y *E. coli* 241-L1 muestran a solo resistencia TET y/o a NAL, dos familias diferentes de antibióticos.

Un total de 39 (95%) aislamientos cumplieron la condición de fenotipo de multirresistencia (resistencia a tres o más familias de antibióticos), esto se pone en evidencia observando el elevado coeficiente de MARs que presentan la mayoría de

los aislamientos (Tabla 35). El coeficiente de MARS varía entre 0,04 y 0,83 con la particularidad que el 78% (32/41) de los aislamientos tiene un coeficiente mayor o igual a 0,4 (resistentes a 7 familias diferentes de antimicrobianos).

**Tabla 35:** Perfiles de resistencia a antimicrobianos en los diferentes serovariedades de *E. coli* recuperadas de pollos parrilleros

Serovariedad (N)	Perfil de antimicrobianos(23)	Coefficiente de MARS
<i>E. coli</i> 91-8	AMP-CXM-CRO-CTX-CAZ-FOX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-SXT-AMC-CO	0,83
<i>E. coli</i> 91-7/90-8	AMP-CXM-CRO-CTX-FOX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-SXT-AMC-CO-AZT	0,83
<i>E. coli</i> 241-P3	AMP-CXM-CRO-CTX-FOX-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-SXT-AMC-CO-AZT	0,78
<i>E. coli</i> 241-K2	AMP-CXM-CRO-CTX-CAZ-FEP-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-SXT-AMC-CO-AZT	0,74
<i>E. coli</i> 90-17	AMP-CXM-CRO-CTX-CAZ-FOX-FEP-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-AMC-CO-AZT	0,74
<i>E. coli</i> 90-13/ 90-14	AMP-CXM-CRO-CTX-CAZ-FEP-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-AMC-CO-AZT	0,7
<i>E. coli</i> 91-17	AMP-CXM-CRO-CTX-CAZ-FEP-KA-GEN-ST-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-CO-AZT	0,7
<i>E. coli</i> 241-P4	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-SXT-AMC-CO-AZT	0,7
<i>E. coli</i> 91-23	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT-SXT-CO-AZT	0,7
<i>E. coli</i> 241-L3	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT-SXT-AMC-AZT	0,7
<i>E. coli</i> 90-10	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT-AMC-CO-AZT	0,7
<i>E. coli</i> 241-K1	AMP-CXM-CRO-CTX-CAZ-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CFT-SXT-CO-AZT	0,65
<i>E. coli</i> 90-18	AMP-CXM-CRO-CTX-CAZ-FEP-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-SXT-AMC-CO	0,65
<i>E. coli</i> 241-B1	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT-SXT-AZT	0,65
<i>E. coli</i> 241-K3	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT-AMC-AZT	0,65
<i>E. coli</i> 241-Z1/241-Z2	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT-CO-AZT	0,65
<i>E. coli</i> 91-22	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-ST-NAL-CIP-ENR-CFT-SXT-AMC-CO-AZT	0,61
<i>E. coli</i> 241-P2	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT-SXT-AZT	0,61
<i>E. coli</i> 241-K4	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-ST-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-SXT-CO-AZT	0,61
<i>E. coli</i> 241-P1	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-ST-NAL-CIP-ENR-CFT-SXT-CO-AZT	0,61
<i>E. coli</i> 241-B3	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-ST-NAL-CIP-ENR-CLR-CFT-SXT-CO	0,57
<i>E. coli</i> 241-Z3	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-GEN-ST-NAL-CIP-ENR-CFT-CO-AZT	0,57
<i>E. coli</i> 241-L2	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CFT	0,57
<i>E. coli</i> 91-21	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-TET-NAL-CIP-ENR-CFT-CO-AZT	0,52
<i>E. coli</i> 241-S4	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-KA-ST-NAL-CIP-ENR-CFT-AMC	0,52
<i>E. coli</i> 241-S1	AMP-CXM-CRO-CTX-FEP-ST-NAL-CIP-ENR-CFT-CO	0,48
<i>E. coli</i> 90-16	AMP-GEN-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-SXT-AMC-CO	0,48
<i>E. coli</i> 90-15	AMP-ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-SXT-AMC-CO	0,43
<i>E. coli</i> 91-13	ST-TET-NAL-CIP-ENR-CLR-SXT-AMC-CO	0,4
<i>E. coli</i> 241-B2	KA-ST-TET-NAL-CIP-CLR-SXT	0,3
<i>E. coli</i> 90-6	ST-TET-NAL-CIP-ENR-SXT-AMC	0,3
<i>E. coli</i> 241-S2	ST-TET-NAL-CIP-ENR	0,22
<i>E. coli</i> 91-16	TET-NAL-ENR-CLR-CO	0,22
<i>E. coli</i> 91-11/91-12	NAL-CIP-ENR-CO	0,17

<i>E. coli</i> 90-2	TET-NAL-CIP-ENR	0,17
<i>E. coli</i> 241-S3	TET-NAL	0,08
<i>E. coli</i> 241-L1	TET	0,04

### Análisis de mecanismos de $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G)

Los aislamientos de *E. coli* recuperados de aves que mostraron resistencia a las C3G (n=29, 70,7%), se sometieron a ensayos fenotípicos para detectar la producción de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC o BLEE.

Se observó sinergia positiva en los ensayos de detección fenotípica de AmpC empleando discos con ácido fenil-borónico (BOR) en un único aislamiento (Tabla 36). El aislamiento mencionado (*E. coli* 241-P3) presentó en el antibiograma características similares al observado en la Figura 14.

**Tabla 36:** Test fenotípico y confirmatorio para AmpC y BLEE en los aislamientos resistentes a C3G

Cepas	FOX	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/CLA	CAZ/CLA	Aumento $\geq 5$ mm	Efecto con BOR	B-lactamasa
<i>E. coli</i> 241-P3	R	S	R	9	22	15	25	Ausente	POSITIVO	AmpC
<i>E. coli</i> 90-08	R	R	R	11	17	15	21	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 90-10	S	R	R	9	22	28	26	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 90-13	R	R	R	9	23	28	24	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 90-14	S	R	R	9	20	28	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 90-17	R	R	R	9	16	23	21	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 90-18	S	R	S	9	20	25	26	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 91-07	I	R	R	9	25	25	25	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 91-08	I	R	R	6	18	19	19	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 91-17	S	R	R	12	13	15	29	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 91-21	S	R	R	9	24	29	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 91-22	S	R	R	9	25	29	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 91-23	S	R	R	9	25	29	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-S1	S	R	R	14	26	26	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-S4	S	R	R	11	25	25	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-L2	S	R	R	8	23	22	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-L3	S	R	R	6	21	11	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-P1	S	R	R	10	21	23	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-	S	R	R	12	23	22	24	Presente	NEGATIVO	BLEE

P2										
<i>E. coli</i> 241-P4	S	R	R	9	25	23	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-Z1	S	R	R	9	24	24	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-Z2	S	R	R	9	22	22	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-Z3	S	R	R	9	21	25	25	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-K1	S	R	R	14	9	26	24	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-K2	S	R	R	9	23	24	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-K3	S	R	R	9	22	25	28	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-K4	S	R	R	9	21	25	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-B1	S	R	R	9	25	23	27	Presente	NEGATIVO	BLEE
<i>E. coli</i> 241-B3	S	I	R	12	27	23	29	Presente	NEGATIVO	BLEE

Se observó una ampliación en el halo de inhibición en los ensayos de detección fenotípica de BLEE en un total de 28 de éstos aislamientos de *E. coli*. Los 28 aislamientos mencionados presentaron en el antibiograma características similares al observado en la Figura 20. Estos resultados se detallan en la Tabla 36.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que la prevalencia de AmpC en los aislamientos de *E. coli* es menor que la de BLEE (2,4 %; 1/41) que la prevalencia de BLEE (68,3%; 28/41). Considerando solo los aislamientos con resistencia a C3G, se puede destacar que el principal mecanismo responsable de dicha resistencia, es la producción de enzimas tipo BLEE (96,5%; 28/29).

### Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas

Se llevó a cabo la PCR *multiplex* empleando como templado ADN total obtenido por lisis térmica de las colonias.

En 4/6 aislamientos, que mostraron resistencia (o intermedio) a FOX, se obtuvo el tamaño de amplicón esperado para la familia CIT. En los 4 aislamientos de *E. coli* (90-8, 90-13, 90-17 y 241-P3), que dieron positiva a la reacción de PCR para el fragmento CIT, se pudo amplificar el gen completo de *bla<sub>CMY</sub>* y el posterior análisis

*in silico* de las secuencias nucleotídicas permitió confirmar la presencia de la variante de *bla*<sub>CMY-2</sub> (Tabla 37).

En todos los aislamientos positivos para el ensayo confirmatorio de  $\beta$ -lactamasa de tipo BLEE (donde se observó un incremento en el halo de inhibición de 5 mm en los discos conteniendo el sustrato más el inhibidor), se determinó la presencia de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, mediante la utilización de *primers* universales para genes tipo *bla*<sub>CTX-M-like</sub>. Como se obtuvo el amplicón del tamaño esperado, se realizaron las reacciones de PCR específicas para los 5 grupos de *bla*<sub>CTX-M</sub> característicos. Los amplicones obtenidos en todos los casos fueron secuenciados.

Luego del análisis de la secuencia nucleotídica y su comparación con la base de datos se observó que 26/28 (92,8%) de las EC poseen como mecanismo de resistencia el gen que codifica para CTX-M-2. De estos 26 aislamientos, tres aislamientos presentan conjuntamente los genes CMY-2; cinco de los aislamientos albergaron genes que codifican para CTX-M-2 junto a CTX-M-14. Es de destacar solo dos aislamientos codifican específicamente para CTX-M-14 (Tabla 37).

**Tabla 37:** Determinantes AmpC y BLEE encontradas en los aislamientos de *E. coli* (Año 2014)

	Aislamiento	Provincia	AmpC	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
<i>E. coli</i>	P3	Bs As	CMY-2	
<i>E. coli</i>	90-08	Bs As	CMY-2	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	90-10	Bs As		<b>CTX-M-2 + CTX-M-14</b>
<i>E. coli</i>	90-13	Bs As		<b>CTX-M-2 + CTX-M-14</b>
<i>E. coli</i>	90-14	Bs As		CTX-M-2
<i>E. coli</i>	90-17	Entre Ríos	CMY-2	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	90-18	Entre Ríos		CTX-M-2
<i>E. coli</i>	91-07	Entre Ríos	CMY-2	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	91-08	Entre Ríos		CTX-M-2
<i>E. coli</i>	91-17	Entre Ríos		CTX-M-2
<i>E. coli</i>	91-21	Entre Ríos		CTX-M-2
<i>E. coli</i>	91-22	Entre Ríos		CTX-M-2
<i>E. coli</i>	91-23	Entre Ríos		<b>CTX-M-2 + CTX-M-14</b>
<i>E. coli</i>	241-S1	Bs As		<b>CTX-M-14</b>
<i>E. coli</i>	241-S4	Bs As		CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-L2	Bs As		CTX-M-2

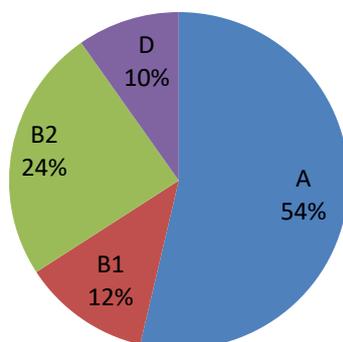
<i>E. coli</i>	241-L3	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-P1	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-P2	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-P4	Bs As	<b>CTX-M-2 + CTX-M-14</b>
<i>E. coli</i>	241-Z1	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-Z2	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-Z3	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-K1	Bs As	<b>CTX-M-14</b>
<i>E. coli</i>	241-K2	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-K3	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-K4	Bs As	<b>CTX-M-2 + CTX-M-14</b>
<i>E. coli</i>	241-B1	Bs As	CTX-M-2
<i>E. coli</i>	241-B3	Bs As	CTX-M-2

### Determinación de los grupos filogenéticos

Los grupos filogenéticos se determinaron mediante *PCR- multiplex* en los aislamientos pertenecientes a *E. coli* de aves, siguiendo el esquema planteado por *Clermont et al (108)*; en el que se detectaron tres genes diferentes: *chuA*, *yjaA* y *tspE4R*.

Esta metodología permitió la clasificación en 4 grupos filogenéticos (o filogrupos) que se muestran en la figura 31; en la que se observa una población heterogénea, con todos los grupos presentes y se destaca el filogrupo A siendo el más prevalente (54%) en los aislamientos. En menor medida se observaron los restantes grupos filogenéticos (Figura 31).

### Grupo filogenético en *E. coli* recuperadas de aves



**Figura 31:** Distribución de los diferentes grupos filogenéticos en los aislamientos de *E. coli*.

Al analizar la distribución de los distintos mecanismos de resistencia en los 29 aislamientos de *E. coli* con resistencia a C3G se observó que en el grupo D se encontraron solo aislamientos portadores de CTX-M-2 (4/4), mientras que los restantes filogrupos mostraron una distribución de  $\beta$ -lactamasas heterogénea (Figura 31), en el grupo A encontramos 1 aislamiento productor de CTX-M-14, 1 de CTX-M-2 + CTX-M-14, 1 de CTX-M-2 + CMY-2 y mostrando 8 aislamientos productores de CTX-M-2.

En el **grupo B1** encontramos 2 aislamientos productores de CTX-M-2, 1 de CTX-M-14 y 1 de CTX-M-2 + CTX-M14, no se observó ningún productor de CMY-2; en el **grupo B2**, encontramos 1 aislamiento productor de CMY-2, 4 de CTX-M-2, 2 aislamientos produciendo CTX-M-2 +CMY-2 y 3 productores de CTX-M-2 + CTX-M-14 (Tabla 38).

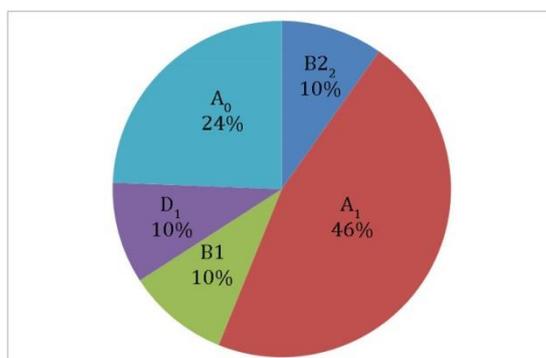
**Tabla 38:** Distribución de  $\beta$ -lactamasa en los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli*

Grupo filogenético	Genes de $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE)	Nº de aislamientos	Nº/total (%)
A	CTX-M-2	8	8/29 (27,6%)
A	CTX-M-14	1	1/29 (3,4%)
A	CTX-M-2 + CTX-M-14	1	1/29 (3,4%)

A	CTX-M-2 + CMY	1	1/29 (3,4%)
B1	CTX-M-2	2	2/29 (7%)
B1	CTX-M-14	1	1/29 (3,4%)
B1	CTX-M-2 + CTX-M-14	1	1/29 (3,4%)
B2	CMY-2	1	1/29 (3,4%)
B2	CTX-M-2	4	4/29 (14%)
B2	CTX-M-2 + CMY	2	2/29 (7%)
B2	CTX-M-2 + CTX-M-14	3	3/29 (10,3%)
D	CTX-M-2	4	4/29 (14%)

Se realizó la sub-clasificación de los grupos filogenéticos determinados anteriormente en subtipos específicos, en base a la presencia o ausencia de tres fragmentos de ADN: *chuaA*, *TspE4.C2* y *jyaA* (172). El filogrupo A, fue representado por 56% de los aislamientos (46% fueron del subgrupo A<sub>1</sub> y el 10% del subgrupo A<sub>0</sub>). El grupo filogenético B2, fue importante, pero en menor medida (24% fueron del subgrupo B2<sub>2</sub>). De los restantes los aislamientos de los filogrupos D y B1 estuvieron representados por 10% (subgrupo D<sub>1</sub>) y mismo porcentaje para los aislamientos B1 (Figura 32).

Subgrupos filogenéticos de *E. coli* recuperadas de aves

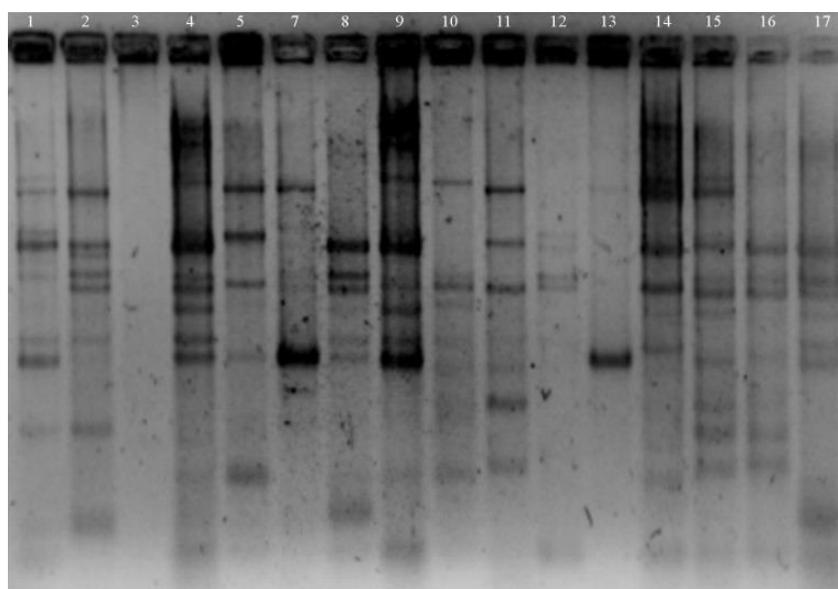


**Figura 32:** Sub-clasificación de grupos filogenéticos en *E.coli* recuperadas de aves

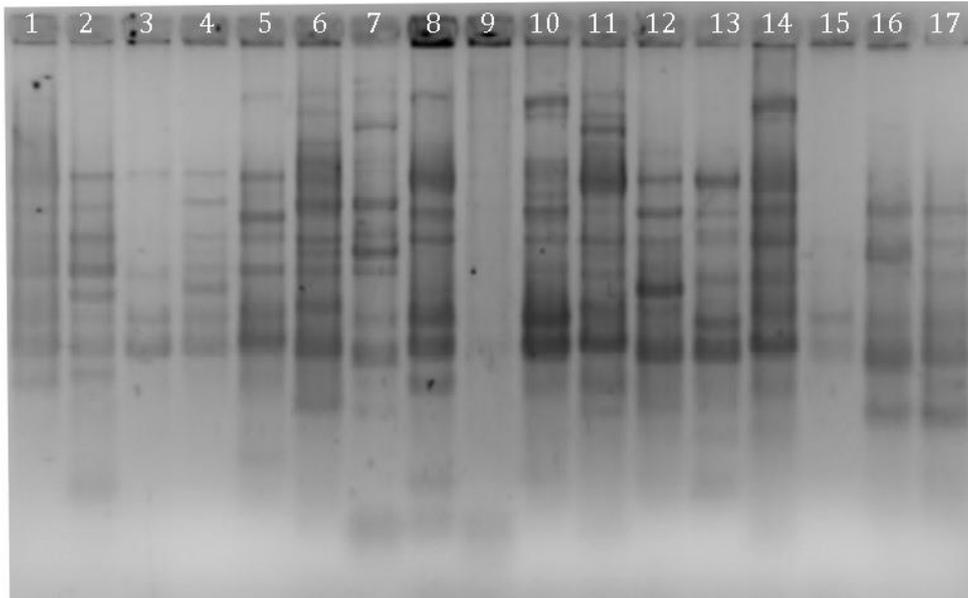
**Tipificación molecular de los microorganismos productores de AmpC y bla<sub>CTX-M</sub> por técnicas basadas en PCR**

En aquellos aislamientos productores de AmpC y *bla*<sub>CTX-M</sub> de *E. coli*, se realizó la tipificación molecular de los mismos a través de ERIC-PCR y REP-PCR, para determinar la relación clonal entre dichos aislamientos. Esto se realizó por grupo dependiendo de la enzima presente en los diferentes aislamientos.

Aquellos *E. coli* productores de CTX-M-2, mostraron heterogeneidad clonal en el análisis realizado por REP-PCR/ERIC-PCR, no se observó ningún patrón de amplificación semejante (Figura 33-A y 33-B).

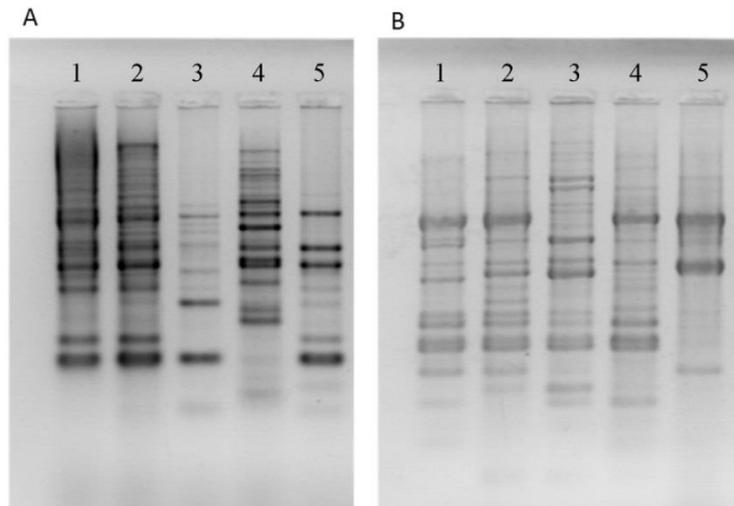


**Figura 33-A:** Patrones obtenidos por REP-PCR en aislamientos productores de *E. coli*. CTX-M-2. **Calle 1:** EC 90-14, **calle 2:** EC 91-7, **calle 3:** EC 91-17, **calle 4:** EC 91-21, **calle 5:** EC 91-22, **calle 6:** EC 241-P1, **calle 7:** EC 241-P2, **calle 8:** EC 241 -Z1, **calle 9:** EC241- Z2, **calle 10:** EC 241- Z3, **calle 11:** EC 241-K2, **calle 12:** EC 211-K3, **calle 13:** EC 241-L2, **calle 14:** EC 241- L3, **calle 15:** EC 241-B1, **calle 16:** EC 241-B2 y **calle 17:** EC 241-S4.



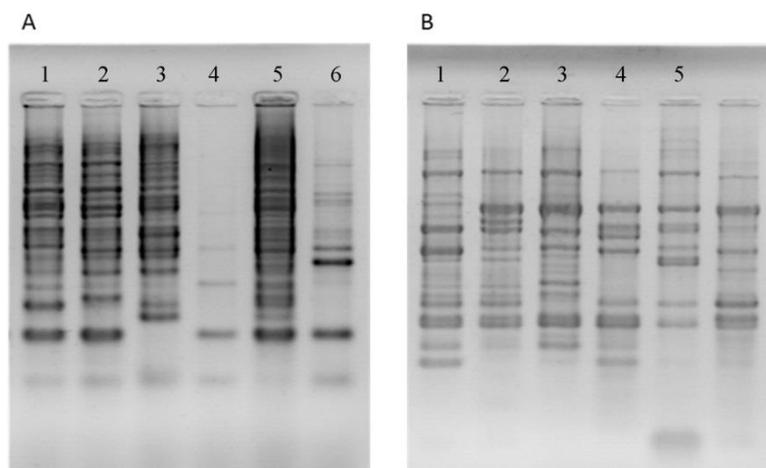
**Figura 33-B:** Patrones de bandas obtenidos por ERIC-PCR en aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M-2. **Calle 1:** EC 90-14, **calle 2:** EC 91-7, **calle 3:** EC 91-17, **calle 4:** EC 91-21, **calle 5:** EC 91-22, **calle 6:** EC 241-P1, **calle 7:** EC 241-P2, **calle 8:** EC 241 -Z1, **calle 9:** EC241- Z2, **calle 10:** EC 241- Z3, **calle 11:** EC 241-K2, **calle 12:** EC 211-K3, **calle 13:** EC 241-L2, **calle 14:** EC 241- L3, **calle 15:** EC 241-B1, **calle 16:** EC 241-B2 y **calle 17:** EC 241-S4.

Para los aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M-14, también se realizó la tipificación clonal mediante REP-PCR/ERIC-PCR y (Figura 34-A y 34-B). En los 2 aislamientos de *E. coli* 90-10 y 90-13 se observó que el patrón obtenido mediante REP-PCR, parecen idénticos aunque con ERIC-PCR se observan sutiles diferencias. El resto de los aislamientos fueron clonalmente diferentes.



**Figura 34:** A- Patrones obtenidos mediante REP-PCR en aislamientos productores de CTX-M-2 y M-14. **Calle 1:** EC 90-13, **calle 2:** EC 90-10, **calle 3:** EC 91-23, **calle 4:** EC 241-P4 y **calle 5:** EC 241- K4. B- patrones obtenidos mediante ERIC-PCR en aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M14. **Calle 1:** EC 90-13, **calle 2:** EC 90-10, **calle 3:** EC 91-23, **calle 4:** EC 241-P4 y **calle 5:** EC 241- K4.

Los aislamientos productores de CTX-M-14 (*E. coli* 241-S1, K1), los productores de CTX-M2 + CMY-2 (*E. coli* 90-17, 91-7 y 90-8) y el productor de CMY-2 (*E. coli* 241-P3) mostraron en principio, heterogeneidad clonal en el análisis por REP-PCR/ERIC-PCR ya que no se observó ningún patrón de amplificación idéntico (Figura 35-A y 35-B).



**Figura 35:** A- Patrones obtenidos mediante ERIC-PCR en aislamientos productores de CTX-M14, CTX-M2+CMY-2 y CMY-2. **Calle 1:** EC 241-S1, **calle 2:** EC 241-K1, **calle 3:** EC 90-17, **calle 4:** EC 91-7, **calle 5:** EC 90-8 y **calle 6:** EC 241-P3. B- Patrones obtenidos

mediante REP-PCR en aislamientos productores de CTX-M14, CTX-M2+CMY-2 y CMY-2. **Calle 1:** EC 241-S1, **calle 2:** EC 241-K1, calle 3: EC 90-17, **calle 4:** EC 91-7, **calle 5:** EC 90-8 y **calle 6:** EC 241-P3.

En síntesis, analizando todos los aislamientos resistentes a C3G en su conjunto se observó que la población analizada es heterogénea, ya que no mostraron ningún patrón de amplificación similar ya sea mediante ERIC-PCR y REP-PCR. *E. coli* 90-10 y 90-13 productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 fueron los únicos aislamientos que presentaron el mismo patrón, lo que sugiere identidad clonal.

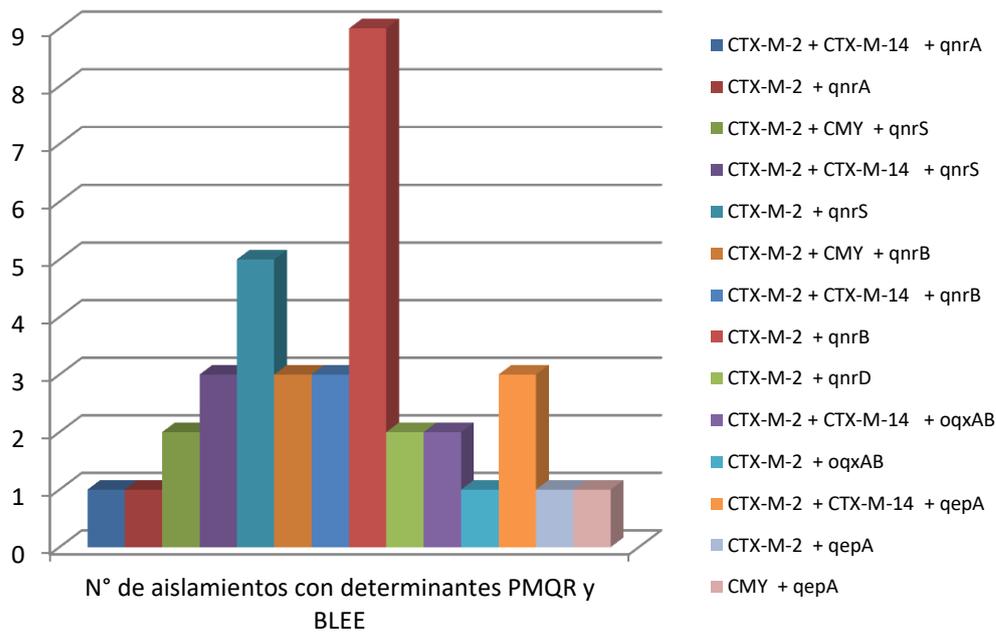
### DetECCIÓN DE GENES PMQR

En los aislamientos analizados de *E. coli* se detectó la presencia de los marcadores PMQR mediante PCR en el 73,2% (30/41), se observó una gran variabilidad de determinantes PMQR expresados. Los más prevalentes fueron *qnrB* (22/41) y *qnrS* (19/41). Otros PMQRs identificados fueron *qnrA* (2/41), *qnrD* (3/41), las bombas de eflujo *oqxAB* (6/41) y *qepA* (4/41) (Tabla 39), mientras que *qnrC* y *aac(6)-Ib-cr* no fueron detectados.

**Tabla 39:** Determinantes PMQR en aislamientos de *E. coli*

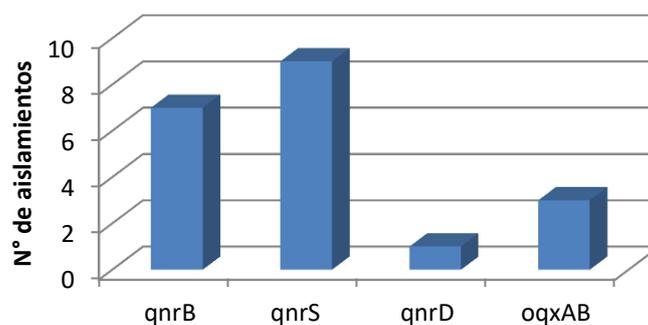
Totales (n=41)	Nº
<i>qnrA</i>	2
<i>qnrS</i>	19
<i>qnrB</i>	22
<i>qnrD</i>	3
<i>oqxAB</i>	6
<i>qepA</i>	4

Se analizaron los aislamientos que presentaron con los determinantes PMQR y genes que codifican para las BLEE, conjuntamente. Un 46,3% (19/41) de las *E. coli* estudiadas portan ambos grupos de genes. En la figura 36, se detallan las combinaciones determinantes PMQR que se encontraron. No se observó ninguna asociación entre la presencia de BLEE y algún mecanismo de PMQR (Figura 36).



**Figura 36:** Número de aislamientos portadores de BLEE y PMQR en *E. coli* aves.

Además, se observó una gran variabilidad de determinantes PMQR en los aislamientos sensibles a C3G (sin BLEE) con una similar proporción en los genes *qnrB* y *qnrS*. Algunos aislamientos presentaron *qnrD* y *oqxAB*, pero en menor proporción (Figura 37).



**Figura 37:** Número de aislamientos de *E. coli* portando solo determinantes PMQR, en aislamientos sensibles a C3G.

### Determinación del fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a FQ

El análisis de fenotipos de sensibilidad a FQ, se realizó en forma discriminada, por un lado con todos los aislamientos de *E.coli* recuperadas de aves (Tabla 40), y por otro lado, con los aislamientos R3G (Tabla 41).

**Tabla 40:** Interpretación del test de difusión en discos evaluando la sensibilidad a fluoroquinolonas en los aislamientos de *E.coli* (n=41), analizados en base a los criterios establecidos por CLSI

NAL	CIP	ENR	PMQR
S a NAL (1)	S a CIP (11)	S a ENR (1)	1 qnrS + 1 oqxAB
I a NAL (1)	I a CIP (1)	I a ENR (1)	1 qnrB
R a NAL (39)	S a CIP (3)	S a ENR (2)	2 oqxAB
		I a ENR (1)	1 qnrB + 1 qnrS
	I a CIP (8)	I a ENR (5)	1 qnrB + 3 qnrS
		R a ENR (3)	2 qnrB + 2 qnrS + 1qnrD
R a CIP (28)	R a ENR (28)	16 qnrB + 11 qnrS + 5 qepA+ 3 oqxAB + 2qnrA+ 2 qnrD	

Entre paréntesis se indicó la cantidad de aislamientos con el fenotipo S (sensible), I (intermedio) y R (resistente) a NAL (ác. nalidíxico), CIP (ciprofloxacina) y ENR (enrofloxacina). También se señaló la cantidad total de aislamientos portadores de determinantes PMQR.

Como se observa en la Tabla 40, 28/41 (68,3%) de los aislamientos poseen resistencia completa a NAL y CIP. También se observó resistencia completa a ENR, a diferencia de lo observado para los aislamientos de *Salmonella* recuperados de aves. En los 28 aislamientos se observó la presencia de diferentes combinaciones de determinantes PMQR.

Se observó que aquellos aislamientos con sensibilidad a NAL, nunca presentan sensibilidad disminuida (I) o resistencia a CIP, igualmente en aquellos aislamientos con sensibilidad disminuida a NAL, no muestran resistencia a CIP. Solo en aquellos aislamientos R a NAL, puede presentar las tres variantes de S, I y R a CIP.

Solo en 8 de los 39 aislamientos con resistencia a NAL, se deberían informar que tienen el fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a ciprofloxacina. Además, al analizar la ocurrencia de los determinantes PMQR en estos aislamientos, se puede observar que todos presentan diferentes determinantes PMQR.

Solo 1 aislamientos poseen el fenotipo salvaje, es decir completamente sensibles a NAL, CIP y ENR; y mostró la presencia de genes *qnrS* y *oqxAB*.

**Tabla 41:** Interpretación del test de difusión en discos evaluando la sensibilidad a fluoroquinolonas en los aislamientos de *E.coli* que mostraron resistencia a C3G (n=30), analizados en base a los criterios establecidos por CLSI

NAL	CIP	ENR	PMQR
I a NAL (1)	I a CIP (1)	I a ENR (1)	1 qnrB
R a NAL (29)	S a CIP (1)	S a ENR (1)	0
	I a CIP (5)	I a ENR (3)	1 qnrB
		R a ENR (2)	1 qnrB + 1 qnrS + 1qnrD
	R a CIP (23)	R a ENR (23)	13 qnrB + 8 qnrS + 5 qepA+ 2 oqxAB + 2qnrA+ 1 qnrD

Como se observa en la Tabla 41, 23/30 (76,6%) de los aislamientos poseen resistencia completa a NAL, CIP y ENR. En los 23 aislamientos se observó la presencia de diferentes combinaciones variada de determinantes PMQR. Se observó que aquellos aislamientos con sensibilidad disminuida a NAL, no muestran resistencia a CIP. Solo en aquellos aislamientos R a NAL, puede presentar las tres variantes de S, I y R a CIP.

Solo en 5 de los 29 aislamientos con resistencia a NAL, se deberían informar que tienen el fenotipo inusual de sensibilidad disminuida a ciprofloxacina. Además, al

analizar la ocurrencia de los determinantes PMQR en estos aislamientos, se puede observar que todos presentan diferentes determinantes PMQR.

Ninguno de los aislamientos resistentes a C3G presentan el fenotipo salvaje, es decir completamente sensibles a NAL, CIP y ENR.

De la misma manera que se ensayó pefloxacina para los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperadas de aves., se utilizó este antimicrobiano para detectar sensibilidad disminuida a ciprofloxacina en los aislamientos de *E. coli* (Tabla 42).

**Tabla 42:** Determinación del fenotipo de sensibilidad a FQ en *E. coli* empleando los lineamientos de Whonet

Fenotipo	CIP (mm)	NAL (mm)	PEF (mm)	<i>E.coli</i> (n=40)	PMQR	Interpretación
2	≤20	≤20	≤23	37	Combinación de PMQR	Resistente
3	21-30	≤20	≤23	4	1 qnrB+ 3 qnrS+ 2 oqxAB	Sensibilidad disminuida a FQ

Como se puede observar en la Tabla 42, la mayoría de los aislamientos presentan el fenotipo 2, lo cual indicaría que estos aislamientos poseen una combinación de mecanismos de resistencia, los cuales son responsables de dicho patrón.

Solo 4/41 aislamientos de *E.coli* presentaron sensibilidad disminuida a CIP, es decir con un halo de inhibición de 21-30 mm. No se observó la presencia del fenotipo 1 (salvaje), tampoco del fenotipo 4 que se asocia con la producción de la enzima *aac(6)-Ib-cr*.

Estos resultados nos permiten inferir que todos los aislamientos con sensibilidad disminuida a CIP fueron resistentes a PEF, y todos los aislamientos resistentes a PEF amplificaron para algún determinante PMQR.

#### Mcr-1 en aislamientos de *Escherichia coli* en aves

Como se dijo anteriormente en este capítulo de resultados, mediante difusión con discos (Anexo: carga de disco y punto de corte utilizados) se detectó solo un 27% de sensibilidad a COL. Este resultado motivó el estudio de la resistencia en estos aislamientos (30/41).

En primer lugar, se determinó la CIM (concentración inhibitoria mínima) de COL mediante el método de microdilución en caldo. En el estudio se incluyeron los 11 aislamientos categorizados como sensibles por difusión. Los resultados fueron interpretados de acuerdo a los lineamientos establecidos por EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- version 6.0) que considera un aislamiento resistente a colistina cuando la CIM es  $> 2 \mu\text{g/ml}$ .

Mediante esta metodología se obtuvo un total de 31 aislamientos (75, 6%) resistentes a COL, observándose una correlación con la determinación cualitativa de la resistencia. En general, los aislamientos recuperados de Entre Ríos muestran una CIM más elevada que los aislamientos de Buenos Aires. Más aun, ninguno de los aislamientos de Entre Ríos, resulto sensible a COL: el rango de CIM: observado en los aislamientos de Entre Ríos fue de 4-32  $\mu\text{g/ml}$  con  $\text{CIM}_{50}=8 \mu\text{g/ml}$  y  $\text{CIM}_{90}=32 \mu\text{g/ml}$ ; mientras que el rango de CIM para los aislamientos de Buenos Aires fue de 0.5 - 16  $\mu\text{g/ml}$  con  $\text{CIM}_{50}=8 \mu\text{g/ml}$  y  $\text{CIM}_{90}=8 \mu\text{g/ml}$ .

La detección del gen *mcr-1* fue llevada a cabo empleando primers específicos que se detallan en la sección de materiales y métodos. Este gen se detectó en el 100% (31/31) de los aislamientos resistentes a colistina. Adicionalmente, 3/10 de los aislamientos sensibles a COL, fueron positivos para el gen *mcr-1*, donde la CIM para estos aislamientos fue siempre de 2  $\mu\text{g/ml}$ .

Para confirmar los resultados de la PCR, se amplificó el gen completo de *mcr-1*, empleando la combinación de primers CLR5-F y MCR-1. Todos los amplicones obtenidos fueron secuenciados y mostraron 100% de identidad con la secuencia de referencia depositada en base de datos (GenBank n° de acceso: KU886144.1).

Es oportuno mencionar que previamente se ha demostrado la diversidad clonal mediante ERIC y REP-PCR incluso entre los aislamientos pertenecientes al mismo grupo filogenético. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 43.

**Tabla 43:** Características de E.coli portadora de mcr-1 recuperada de diferentes fincas en Buenos Aires y Entre Ríos, Argentina, 2014.

Provincia	Granja	Aislamiento	Grupo filogenético	CIM de Colistina (µg/ml)	mcr-1	Difusion COL
Buenos Aires	1	<i>E. coli</i> 190-02	A	2 (S)	+	S
		<i>E. coli</i> 241-S1	A	8 (R)	+	S
		<i>E. coli</i> 241-S3	A	1 (S)	Neg	S
	2	<i>E. coli</i> 190-06	A	0,5 (S)	Neg	R
		<i>E. coli</i> 241-S2	A	1 (S)	Neg	R
		<i>E. coli</i> 241-S4	A	1 (S)	Neg	S
	3	<i>E. coli</i> 241-L1	A	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-L2	A	2 (S)	+	S
		<i>E. coli</i> 190-08	B2	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 190-10	B2	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-L3	D	0,5 (S)	Neg	S
	4	<i>E. coli</i> 190-13	A	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 190-14	A	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-P2	A	4 (R)	+	S
		<i>E. coli</i> 241-P3	B2	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-P4	B2	2 (S)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-P1	D	8(R)	+	R
	5	<i>E. coli</i> 190-15	A	8(R)	+	R
		<i>E. coli</i> 190-16	A	4 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-Z1	A	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-Z2	B2	16 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-Z3	B2	8(R)	+	R
	6	<i>E. coli</i> 190-17	A	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 190-18	A	4 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-K1	B1	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-K2	B1	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 241-K3	B2	2 (S)	Neg	S
		<i>E. coli</i> 241-K4	B2	8 (R)	+	R
	7	<i>E. coli</i> 241-B2	A	2 (S)	Neg	S
		<i>E. coli</i> 241-B3	A	8 (R)	+	R
<i>E. coli</i> 241-B1		D	4(R)	+	S	
Entre Ríos	8	<i>E. coli</i> 191-08	A	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 191-07	B2	8 (R)	+	R
	9	<i>E. coli</i> 191-11	A	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 191-12	A	32 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 191-13	B1	16 (R)	+	R
	10	<i>E. coli</i> 191-16	A	4 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 191-17	B2	8 (R)	+	R
	11	<i>E. coli</i> 191-21	B1	8 (R)	+	R
		<i>E. coli</i> 191-23	B1	32 (R)	+	R
<i>E. coli</i> 191-22		D	8 (R)	+	R	

*Estudio de la transferibilidad de mcr-1*

La transferibilidad del plásmido fue ensayada mediante conjugación en medio sólido, empleando como cepa receptora a *E. coli* J53 y Salmonella M1744. Los transconjugantes de *E. coli* fueron seleccionados en medio TSA con ázida sódica (200 µg/ml) y colistina (1 µg/ml); mientras que para Salmonella M1744, se utilizó únicamente colistina (1 y 2 µg/ml). Este ensayo se realizó en 8 aislamientos salvajes seleccionados al azar y se obtuvo éxito con 5 de los aislamientos analizados.

Se comprobó la eficiencia de la conjugación mediante PCR para el gen *mcr-1*. Por otra parte, se realizó ERIC-PCR y REP-PCR para confirmar la identidad de los transconjugantes.

Además, se determinó la CIM mediante microdilución, tanto a las cepas receptoras y a las transconjugantes (Tabla 44), para ser analizadas junto a las cepas dadoras. También, se realizó el perfil de sensibilidad antimicrobiana en los transconjugantes seleccionados por medio de difusión con discos a otras familias de antimicrobianos para evaluar la resistencia co-transferida.

**Tabla 44:** Sensibilidad a COL y a otros antimicrobianos en *E. coli*: comparación entre aislamientos salvajes y transconjugantes seleccionados

Aislamiento	CIM COL	AMP	AMC	CTX	CAZ	FOX	FEP	CFT	KA	GEN	ST	TET	NAL	CIP	CLR	SXT
<i>E. coli</i> 241-L1	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
EC 241-L1 TC	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>E. coli</i> 241-P3	8	R	R	R	S	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R
EC 241-P3 TC	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> 190-14	8	R	I	R	I	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
EC 190-14 TC	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<i>E. coli</i> 190-17	8	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
EC 190-17 TC	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> 191-07	8	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

<b>EC 191-07 TC</b>	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>EC 191-07 TCS</b>	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b><i>E. coli</i> J53</b>	0, 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b><i>Salmonella</i> M1744</b>	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

\*TC: transconjugantes obtenidos empleando como cepa receptora *E. coli* J53; \*TCS, transconjugantes obtenidos empleando como cepa receptora *Salmonella* M1744.

Analizando las CIMs obtenidas, se puede comprobar que el fenotipo de resistencia a COL observado en las transconjugantes, demuestra la transferencia eficiente del plásmido mediante conjugación. También se observa que se logró la conjugación empleando como cepa receptora tanto a *E. coli* J53 y *Salmonella* M1744. Estos ensayos demuestran que el determinante de resistencia *mcr-1* se halla localizado en un plásmido conjugativo.

Como detalla en la tabla 44, y teniendo en cuenta las familias de antimicrobianos ensayadas, en general, no se observa co-transferencia de resistencia a antimicrobianos cuando la hubiere. Solo uno de los aislamientos EC 241-L1 TC, presentó resistencia a TET que pareciera proceder de la cepa dadora.

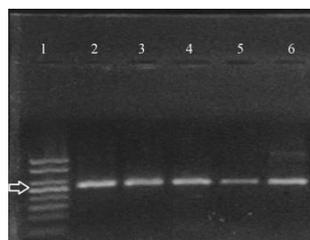
Un caso similar fue observado en EC 190-14 TC, donde mostró sensibilidad disminuida a NAL. Ambos transconjugantes, EC 191-07 TC y EC 191-07 TCS, procedentes de la misma cepa dadora mostraron sensibilidad disminuida a NAL. Se evaluó mediante determinación por PCR para el gen *qnrB*, la transferencia de este determinante a los respectivos TCs (Tabla 45).

**Tabla 45:** Características de los aislamientos de *E.coli* y sus TCs

Aislamientos	Difusión en discos		PCR
	NAL	CIP	PMQR/CTX-M/ <i>mcr-1</i>
<b><i>E. coli</i> 190-14</b>	R	R	<i>qnrB+</i> <i>qnrS+</i> CTX-M-2+ <i>mcr-1</i>
<b>EC 190-14 TC</b>	I	S	<i>qnrB+</i> <i>mcr-1</i>
<b><i>E.coli</i> 191-07</b>	I	S	<i>qnrB+</i> CTX-M-2+ CMY+ <i>mcr-1</i>
<b>EC 191-07 TC</b>	I	S	<i>qnrB+</i> <i>mcr-1</i>
<b><i>E. coli</i> 190-17</b>	R	R	<i>qnrB+</i> <i>qnrS+</i> CTX-M-2+ CMY
<b>EC 190-17 TC</b>	S	S	<i>mcr-1</i>
<b><i>E. coli</i> J53</b>	S	S	-

\*TC: transconjugantes obtenidos empleando como cepa receptora *E. coli* J53

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante prueba de sensibilidad y PCR, se observó la co-transferencia eficiente de *qnrB* de las *E. coli* dadoras a los transconjugantes de EC 190-14 TC y EC191-07 TC (Figura 38). Las características de los mismos se observan en la Tabla 45.



**Figura 38:** PCR para el determinante *qnrB* en aislamientos de *E. coli* dadoras como transconjugantes. **Calle 1:** marcador 50 bp (Inbio Highway), **calle 2:** *E. coli* 90-14, **calle 3:** EC 90-14 TC, **calle 4:** *E. coli* 91-7, **calle 5:** EC 91-7 TC, **calle 6:** control positivo.

#### Caracterización de los plásmidos que albergan *mcr-1*

Continuando con la caracterización del mecanismo *mcr-1*, se determinó el grupo de incompatibilidad y los sistemas toxina-antitoxina de los plásmidos involucrados en estos aislamientos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 46.

**Tabla 46:** Determinación del grupo de incompatibilidad y de los sistemas toxina-antitoxina (TA) en *E. coli* (EC) dadoras y transconjugantes

Aislamientos	Grupo de Incompatibilidad	Sistema Toxina-Antitoxina							
		<i>pemK</i>	<i>hok-sok</i>	<i>ccdA-B</i>	<i>srnB-C</i>	<i>relE</i>	<i>pndA-C</i>	<i>vagC-D</i>	<i>parD-E</i>
<i>E. coli</i> 241-L1	IncK	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 241-L1 TC	IncK, IncP	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>E. coli</i> 241-P3	IncFIB, IncI2, IncF, IncK	-	+	+	+	+	+	+	+
EC 241-P3 TC	IncK, IncP	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>E. coli</i> 190-14	IncFIB, IncF, IncK	-	-	+	-	+	-	+	+
EC 190-14 TC	IncK	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>E. coli</i> 190-17	IncFIB, IncHI1, IncI2,	-	+	+	+	+	+	-	+

	IncF, IncK								
<b>EC 190-17 TC</b>	IncK	-	-	-	-	+	-	-	+
<b><i>E. coli</i> 191-07</b>	IncFIB, IncF, IncK	-	+	+	-	+	-	-	+
<b>EC 191-07 TC</b>	IncK, IncP	-	+	-	-	+	-	-	+
<b>EC 191-07 TCS</b>	IncFIIS, IncFIB, IncF, IncK	-	+	+	-	+	-	-	+
<b><i>E. coli</i> J53</b>	IncK, IncP	-	-	-	-	+	-	-	+
<b><i>Salmonella</i> M1744</b>	IncFIIS	-	+	-	-	-	-	-	-

Al analizar los resultados obtenidos tanto para los aislamientos dadores como para los transconjugantes podemos inferir que no poseen un único replicón con un determinado grupo de incompatibilidad plásmidico. Solo en el aislamiento *E. coli* 191-07 y el transconjugante EC 191-07 TCS, comparten los grupos de incompatibilidad IncFIB, IncF, IncK, ausentes en la cepa receptora (*Salmonella* M1744); uno o más de éstos replicones pueden estar regulando el plásmido que contiene el determinante que le confiere resistencia a COL. Al realizar el mismo tipo de análisis con otros transconjugantes obtenidos, podemos observar que en ellos se descarta la presencia de IncF e IncFIB y se observa IncK e IncP, aunque estos replicones fueron simultáneamente detectados en la cepa receptora (*E. coli* j53).

Ninguno de los aislamientos poseen el sistema de TA *pemK*. En *E. coli* 191-07 y EC 191-07 TC, ambos poseen el sistema TA *hok-sok*; es posible pensar que la cepa transconjugante heredó este sistema de TA de la cepa dadora. Al analizar la dadora *E. coli* 191-07 y su transconjugante obtenido desde *Salmonella* M1744, EC 191-07 TCS, ambos muestran el sistema TA *ccdA-B*.

En el resto de los aislamientos no se puede realizar una asociación similar, en el caso de los genes TA *relE* y *parD-E*, ya que tanto las cepas receptoras, como las dadoras y las transconjugantes fueron positivas para sendos genes.

Para el sistema TA *pndA-C*, solo se observó en los aislamientos salvajes *E. coli* 241-P3 y *E. coli* 190-17 y el sistema TA *vagC-D*, se observó en el mismo aislamientos *E.*

*coli* 241-P3 y junto a otro aislado *E. coli* 190-14. Ninguno de estos sistemas fue detectado en los transconjugantes correspondientes.

# Discusión

En este trabajo de tesis se estudiaron poblaciones de *E. coli* patógenas STEC-no 0157 y aislamientos de *E. coli* asumidas comensales obtenidas a partir de materia fecal de granjas de pollos parrilleros. La importancia del estudio de las dos poblaciones bacterianas, *E. coli* STEC y *E. coli* aisladas de pollos parrilleros, radica en que una mayor caracterización de estos aislamientos (el patrón de virulencia y/o el perfil de resistencia a antimicrobianos) es fundamental para la Salud Pública, ya que pueden ser transmitidos entre los animales y desde ellos a el hombre. El monitoreo de la resistencia en bacterias entéricas provenientes de animales sanos, es de gran valor para detectar la tendencia existente en la resistencia. Aunque estas bacterias no son causa frecuente de infecciones en animales, pueden ser reservorios de genes de resistencia y diseminarse a otras bacterias, capaces de causar infecciones en el animal y en el hombre.

Al analizar la población de *E. coli* STEC no-0157, el 87% de los aislamientos productores de toxina shiga analizados contienen el determinante de virulencia *stx1* (55/63), los cuales fueron acompañados por el gen de intimina (*eae*). Intimina es una proteína importante para la patogénesis y en los aislamientos de *E. coli* de recuperados de animales, ésta proteína es descripta en menor proporción, lo que explicaría la menor incidencia de los aislamientos de *E. coli* STEC no-0157 de ocasionar enfermedad en humanos (165). Pero se observó que el 63,5% (40/63) los aislamientos analizados coexisten ambos determinantes de virulencia analizados *stx1+* *eae*, lo cual permitiría catalogarlos en su gran mayoría como potencialmente virulentos, capaces de causar enfermedad.

Al evaluar el perfil de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de la población de *E. coli* STEC, solo se observa sensibilidad del 65,1% (41/63) a AMP; un gran porcentaje de aislamientos codificó para BLEA, TEM-1, siendo este el principal mecanismo de resistencia encontrado en *E. coli* STEC. Sin embargo, se observó un porcentaje elevado de sensibilidad al resto de las C3G y a los aminoglucósidos KA y GEN. Con respecto a las quinolonas, los porcentajes de sensibilidad fueron de NAL 73% (46/63), a CIP 87,3% (55/63) y a ENR 84,1% (53/69). Ninguno de los aislamientos mostró resistencia COL. El porcentaje de sensibilidad más bajo, se obtuvo para TET con el 50,7 % (32/63) de los aislamientos analizados. Los altos

niveles de sensibilidad observados en este trabajo, son similares a los reportados en estudios realizados sobre aislamientos de *E. coli* tanto STEC-O157 como no-O157 (173, 174), realizados en nuestro país. No existen reportes efectuados donde estudien los niveles de sensibilidad en *E. coli* STEC en bovinos.

En nuestro país no existen relevamientos del volumen de antimicrobianos usado en cada especie y no es posible comparar como en ciertos países, que la resistencia puede estar relacionada directamente con el nivel de utilización de antimicrobianos empleados en la producción. Por ejemplo, en Japón las tetraciclinas siguen siendo los antimicrobianos comúnmente utilizados en el sector veterinario, seguido por las sulfonamidas, macrólidos, penicilinas, aminoglucósidos y fenicoles. Estos consumos tienden a ser mayores en la producción de cerdos (54% del consumo total de antimicrobianos), que en la de las aves de corral (16%), y en menor medida en el ganado bovino (8%) (175). En general, se observa que los niveles de resistencia a los antimicrobianos en enterobacterias varían según las especies de animales de consumo a partir de las cuales se las recuperaba (176) y pueden ser afectados principalmente por el volumen de uso de antimicrobianos en cada especie y también por el sistema de explotación (intensivo vs. extensivo). Si se tuvieran datos precisos sobre el empleo de antimicrobianos en nuestra región, se podrían asociar realizar correlaciones entre el uso y la aparición de determinados patrones de resistencia.

Para realizar el estudio de las mutaciones encontradas en la región QRDR, de los genes *gyrA* y *parC* en *E. coli* STEC, se seleccionaron solo los aislamientos que presentan resistencia a NAL. Esto se efectuó con el objetivo de poder asociar el fenotipo de resistencia observado en dichos aislamientos con un determinado patrón de mutaciones en la región QRDR. Del total de los aislamientos analizados 13/17 presentaron la mutación Ser83Leu, presentando valores de CIM de NAL que varían entre de 32 y 256 µg/ml. Reportes indican que una única mutación en *gyrA* en *E. coli* podría ser suficiente para causar altos niveles de resistencia a NAL (177). La sustitución nucleotídica en el codón 83, es la mutaciones más común encontrada en aislamientos de *E. coli* de origen clínico y veterinario. Se ha descrito que mutaciones adicionales en los genes *gyrA* y/o en *parC* ocurren de

manera gradual, y son requeridas para ampliar el espectro de resistencia hacia las fluoroquinolonas (178).

Se pudo establecer un patrón entre el fenotipo y la resistencia observada en los aislamientos de *E. coli* 01/289-1, 09/562-60 y 09/634-5269, que muestran sensibilidad disminuida a CIP y/o ENR; estos aislamientos presentaron dos sustituciones en GyrA, una en posición 83 (Ser83Leu) y otra en posición 87 (Asp87Asn /Asp87Tyr) y una sustitución en ParC (Ser80Ile)(179). Nuestros resultados son idénticos a los reportados por (180), los cuales fueron observados en aislamientos de *E. coli* de diferentes orígenes, entre ellos productos alimenticios de origen animal, muestras fecales de animales sanos (pollos, cerdos y perros) y en muestras de pacientes ambulatorios y sanos en España.

Por otro lado, solo uno de los aislamientos resistentes a CIP, presenta otra sustitución adicional en ParC, Glu84Gly (*E. coli* 01/280-1) y además de presentar dos sustituciones en GyrA, en los aminoácidos Ser83Leu y Ala67Asp. Sustituciones en el aminoácido Ala67, localizada justo en el límite de la región QRDR de GyrA (Ala67-Gln106) ya han sido detectadas pero con baja frecuencia y muchas veces solo se presentó en mutantes generados *in vitro* (178), éste no es nuestro caso. Además, se observó un único aislamiento de los estudiados (*E. coli* 09/197-14) que presenta solo una mutación en Ser83Leu y manifestó el fenotipo de resistencia a CIP.

En la literatura se ha descrito una correlación entre número de mutaciones presentes en la región QRDR y el nivel de resistencia, donde tres mutaciones (dos en GyrA y 1 en ParC) se correlaciona con CIM de CIP entre 8 y 32 µg/ml y cuando se presentan cuatro mutaciones (dos en gyrA y dos en parC) la CIM de CIP asciende a 64 µg/ml (180). Esta premisa no se cumple en los aislamientos analizados en esta tesis, ya que presentan niveles mayores a 64 µg/ml, observándose valores  $\geq 256$  µg/ml. Es probable que nuestros aislamientos muestren la presencia de mecanismos de resistencia acompañantes.

En algunos aislamientos de *E. coli* STEC (3/63) aparte de las mutaciones que se presentan en la región QRDR, se observó la presencia del determinante de

resistencia catalogado como de localización plasmídica (PMQR), de ellos el más frecuente fue *qnrA*. Solo un aislamiento *E. coli* STEC, presentó otras variantes de *qnr* (*qnrS* y *qnrB*) y además posee una única mutación en Ser83Leu (*E. coli* 09/197-14), esto explicaría el fenotipo de resistencia a NAL y a CIP que se observó. Ningún otro determinante PMQR fue encontrado en esta población de microorganismos. Estudios anteriores a éste, reportan que la variante *aac(6')-lb-cr*, frecuentemente está asociada con la presencia de otros determinantes *qnr*, por ejemplo *aac(6')-lb-cr* fue asociada simultáneamente a *qnrS* o *qnrB* (58) en aislamientos de *E. coli* de animales enfermos productores de alimentos, situación diferente a la procedencia de nuestros aislamientos.

Los aislamientos de *E. coli* que fueron recuperados desde material fecal de pollos parrilleros, por siembra directa en agar McConkey sin presión de selección antibiótica, obtenidos desde 11 granjas diferentes pertenecientes a las provincias de Buenos Aires Y Entre Ríos. En éste sistema de producción intensiva de pollos se observó un porcentaje de sensibilidad a AMP de 24,4% (10/41), a C3G como CXM, CTX, CRO del 29,3 % (12/41), (es decir que 29/41 de éstos aislamientos fueron resistentes a C3G). Niveles similares de sensibilidad en sistema de producción similares han sido reportados por Tong y col (181) entre los años 2011-2013, en China. Dentro de las C3G, se destaca el mayor porcentaje de sensibilidad del 83 % (34/41) obtenido para CAZ. También se obtuvo un bajo porcentaje de sensibilidad para CFT de 22 % (9/41) y para FEP del 31,7% (13/41), mientras que para FOX este porcentaje fue mucho más elevado (85,3% ,35/41).

Además de la resistencia a cefalosporinas, se observó resistencia a fluoroquinolonas, tetraciclina, estreptomicina, trimetoprima- sulfametoxazol y colistina. Es de notar que 39 aislamientos (95%) cumplieron la condición de fenotipo de multiresistencia (resistencia a tres o más familias de antibióticos diferentes); este resultado pone en evidencia la situación crítica y alarmante que se está observando en estos sistemas de producción intensivos. Una situación similar se ha reportado previamente (182, 183) en aislamientos de *E. coli* obtenidos desde granjas de pollos de engorde, que mostraron el fenotipo de multiresistencia en el total de aislamientos analizados. Proporciones elevadas de *E. coli* con fenotipos de

multirresistencia (entre un 80 y 95 %) a los mismos antimicrobianos ensayados en nuestro estudio y aislamientos llevando BLEE, ya han sido reportado también en China (184, 185). *E. coli* productora de BLEE recuperada de animales productores de alimentos, se podría considerar como una potencial fuente de infección en humanos. El aumento del número de aislamientos de *E. coli* con BLEE en animales ha planteado una gran preocupación y se está generando una mayor conciencia sobre esta problemática en todo el mundo (181, 186) que no debemos desestimar.

Sistemas de producciones modernos incluyen a menudo el uso de agentes antimicrobianos para prevenir, controlar y tratar infecciones bacterianas; estos agentes son utilizados como promotores de crecimientos en los sistemas de producción avícola (187). El uso generalizado de estos antibióticos tiene sus beneficios para los productores, pero sin duda alguna contribuye al incremento de bacterias multirresistentes. Los factores que pueden influenciar en el desarrollo de la resistencia bacteriana en las granjas son numerosos y dependen del estado de salud de los animales, las prácticas de manejo del productor y el ambiente de producción. Prácticas como el uso de antibióticos de amplio espectro en lugar de antibióticos específicos (188), administraciones en bajas dosis como promotores o el uso de drogas no aprobado o no convencionales, contribuiría al desarrollo de multirresistencia (189).

Al comparar los determinantes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos prevalentes en los aislamientos de *E. coli* analizados, se observa una situación similar a lo observado en los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperadas de aves. Se observó la presencia de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC, como CMY-2, descrita como la  $\beta$ -lactamasas más ampliamente distribuida en enterobacterias (36, 190). En *E. coli* STEC-no 0157 se describió en este trabajo la presencia de dos aislamientos (*E. coli* 01/246-36 y 09/562-60) con genes codificantes para CMY-2, siendo escasos los reportes de ésta enzima en los aislamientos de *E. coli* 0157 (191, 192), como en no-0157. En nuestro país, no existen reportes en de la presencia de este mecanismo de resistencia a C3G en animales. Mientras que en los aislamientos de *E. coli* recuperadas de aves, CMY-2 está presente en 4/29 aislamientos resistentes a C3G.

Ya fueron ampliamente reportadas en aislamientos tanto de *E. coli* como de *Salmonella* spp., que albergan *bla*<sub>CMY-2</sub> recuperados ya sea de animales, del medio ambiente y de muestras de origen clínico (99, 157, 193). La presencia de esta  $\beta$ -lactamasa de tipo AmpC, fue descrita en aislamientos de *E. coli* recuperados de carne de pollo producida en Suecia (194) y en aislamientos de *E. coli* obtenidos de pollo y pavo en Dinamarca (195).

El resto de los aislamientos resistentes C3G, portan uno o más genes de *bla*<sub>CTX-M</sub>. Es decir, de los 29 aislamientos de *E. coli* resistentes a C3G, *bla*<sub>CTX-M</sub> fue el genotipo predominante y la variante alélica prevalente fue CTX-M-2 (26/29), presentándose en combinaciones como CTX-M-2/CTX-M-14 y CTX-M-2/CMY. Aparte solo 2 aislamientos presentaron la variante CTX-M14 y otro aislamiento solo dio positivo para CMY-2. Al contrario de lo observado en *Salmonella* en esta tesis, aquí predominan los aislamientos con BLEE y en especial, CTX-M-2.

La familia de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, CTX-M muestran un alto grado de plasticidad y parecen estar distribuidas geográficamente (30). Como mencionamos anteriormente CTX-M-2 es endémica en nuestro país, ya reportada en humanos (143) pero hasta el momento, no ha sido asociada en aislamientos de origen animal (pollos parrilleros). Tanto Entre Ríos como Buenos Aires, son las principales provincias en donde se encuentran las granjas donde se crían pollos parrilleros (pollos de engorde), no se posee ningún tipo de información sobre la presencia y/o ocurrencia de cepas de *E. coli* con BLEE. Aunque muchas veces no es posible obtener información detallada sobre los antibióticos añadidos a la alimentación de las aves de corral, en circunstancias normales, su uso en la alimentación ejerce una presión de selectiva sobre la colonización intestinal de ciertas bacterias en los animales (186). Esto se ve representado en la gran prevalencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos ensayados.

En nuestro país, no existen reportes de prevalencia de enzimas BLEE tipo CTX-M-2 en aislamientos recuperados de animales, siendo que a nivel humano se encuentra ampliamente diseminada (146). A diferencia de nuestro trabajo, en Brasil, Botelho y col., describieron por primera vez la presencia de CTX-M-15, además de CTX-M-8

y CMY-2, en aislamientos de *E. coli* recuperadas de carne de pollos (196). También, en Brasil describió la prevalencia de BLEE como CTX-M-2, de localización cromosómica en aislamientos de *E. coli* aislada de pollos, también destacaron los riesgos de la presencia de esta bacteria multirresistente en animales productores de alimentos (197). En varios países europeos, describen las BLEE como CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M14, son principalmente asociadas a *E. coli* aisladas de aves de corral (198). Sin embargo, en granjas de pollos de engorde en Japón, Kameyama y col., describieron en aislamientos de *E. coli* resistentes a C3G, diferentes tipos de BLEE, CTX-M1, CTX-M-55, SHV-5 y CTX-M-2 en una menor proporción, siendo más importante la resistencia representada por CMY-2 (199). Estos resultados exponen que en otras regiones y en diferentes partes del mundo, se reporta la presencia de los determinantes BLEE y de tipo AmpC en aislamientos de origen animal y los resultados obtenidos en nuestro trabajo con ambas poblaciones de *Salmonella* spp. y *E. coli* indican que el fenómeno de la multirresistencia y los mecanismos de resistencia descritos en animales productores de alimentos, se puede convertir en un grave problema de salud pública.

Un grupo de investigadores han demostrado que aislamientos extraintestinales de *E. coli* pueden ser divididos en cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D), donde los filogrupos B2 y D, son considerados los más patógenos, ya que es más probable que lleven genes asociados a la virulencia del microorganismo, mientras que los aislamientos que pertenecen a los filogrupos A y B1 lo suelen clasificar como comensales (o no patógenos) (108). Sin embargo, es pertinente destacar que es un análisis probabilístico. En los aislamientos de *E. coli* estudiados, la agrupación filogenética arrojó que 28 aislamientos eran agrupados en los grupos A y B1 (cepas comensales) y el resto, es decir 14 aislamientos eran clasificados como potencialmente virulentos (pertenecientes a los filogrupos B2 y D).

En congruencia con lo determinado anteriormente, más el análisis de clonalidad efectuado con las cepas productoras de CTX-M y CMY, mostraron una distribución heterogénea entre los grupos A, B1, B2 y D, dejando en evidencia que los marcadores de resistencia no muestran preferencia por algún clon en particular. En concordancia con lo reportado por Botelho y col., se detectó una gran

diversidad de aislamientos de *E. coli* obtenidos de pollos que portaban los genes *bla<sub>CMY-2</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>*, presentando una distribución diversa de los diferentes grupos filogenéticos, lo cual apoya la naturaleza no clonal de los aislamientos analizados (196).

La elevada prevalencia de BLEE en *E. coli* comensales aisladas desde animales sanos, sugiere que estas cepas comensales podrían jugar un papel significativo en servir como reservorio de genes de resistencia. Por lo tanto, es muy importante conocer la prevalencia de BLEE de *E. coli* en animales destinados a la alimentación sanos. Es por esta razón que es pertinente destacar los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

Según el esquema planteado por Branger y col., un análisis factorial permitió establecer relaciones entre subgrupos filogenéticos, factores de virulencia, tipo de BLEE producidas y el origen de los aislamientos (infección y colonización). De acuerdo a lo sugerido por Branger y col., se observaría una correlación entre la presencia del filogrupo D1, con menores factores de virulencia y asociados a la colonización, mientras que los filogrupos B2, poseen factores de virulencia y aislamientos con menores tasas de resistencia a fluoroquinolonas. Destacan la asociación entre aislamientos resistentes a fluoroquinolonas y productores de CTX-M, los cuales no poseen factores de virulencia(172). Es decir, la alta tasa de resistencia a FQ y la baja virulencia de aislamientos productores de CTX-M, podría proveerles una ventaja selectiva para la diseminación, especialmente en aquellos ambientes sometidos a la presencia de FQ.

En los aislamientos analizados de *E. coli* los marcadores PMQR más prevalentes fueron *qnrB* (22/41) y *qnrS* (19/41). Nuestros resultados son distintos a los reportados en México (200), también realizado con aislamientos de *E. coli* de aves de corral, quienes no detectaron ningún determinante PMQR, como *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*. Otros PMQRs identificados en los aislamientos de *E. coli* analizados fueron *qnrA* (2/41), *qnrD* (3/41), las bombas de eflujo *oqxAB* (6/41) y *qepA* (4/41), mientras que *qnrC* y *aac(6')-Ib-cr* no fueron detectados. Es de destacar la ausencia de *aac(6')-Ib-cr*, gen que se encuentra ampliamente distribuido en las enterobacterias productoras de BLEE aisladas en humanos. Rincón y col., (103), en

aislamientos de enterobacterias productoras de CTX-M procedentes de origen clínico, reportó con mayor frecuencia aislamientos presentando la variante *aac(6)-Ib-cr*.

Al igual que en los aislamientos de *Salmonella* spp. el análisis de la secuencia nucleotídica del determinante *qnrB* arrojó que la variante alélica prevalente en los aislamientos de *E. coli* de aves fue *qnrB5*. Esta variante alélica no ha sido descrita en Argentina en aislamientos de enterobacterias de origen veterinario y en aislamientos de origen clínico (134). Otro determinante encontrado en los aislamientos de *E. coli* recuperados de aves, como la variante *qnrS1*, ha sido previamente reportada como el marcador más prevalente en *E. coli* aisladas de pollos y aves silvestres en Korea (201). Esta variante, también fue reportada pero de aislamientos de *E. coli* recuperadas de animales de compañía (202) en África; donde solo un aislamiento poseía ambos genes *qnrS1* y también *qnrB5*. Nuestros resultados demuestran que los aislamientos de *E. coli* podrían ser el reservorio no solo de genes PMQR y sino también de BLEE y los animales pueden ser la fuente putativa de éstos genes de resistencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, permitió reportar los primeros aislamientos de *E. coli* con resistencia a colistina de codificación plasmídica obtenidos desde animales, en particular de pollos parrilleros. Esta es la primera descripción en nuestro país de este mecanismo de resistencia de codificación plasmídica procedentes de aislamientos de animales.

*E. coli* recuperados no solo desde animales productores de alimentos, particularmente de pollos, ya fueron reportados en Brasil (203) conteniendo este mecanismo de resistencia. A diferencia del trabajo de Fernandes y col., los aislamientos recuperados aquí no fueron seleccionados empleando ningún medio de selección con antibióticos y es importante destacar el elevado porcentaje (76%) de los aislamientos que mostraron resistencia a colistina y la presencia de este mecanismo.

El gen *mcr-1* fue detectado en los 31 aislamientos de *E. coli* mostrando valores de MIC entre 4 y 32 µg/ml para los recuperados desde las granjas de la provincia de

Entre Ríos y de 0,5 y 16 µg/ml para las de Buenos Aires. Además, 3 de los aislamientos susceptibles ( $MIC_{50} = 2$  µg/ml) fueron positivos a gen *mcr-1*. La presencia del gen en aislamientos susceptibles a colistina también fue reportado por Fernandes *y col.* pero a diferencia de éste trabajo (203), observamos valores de MIC de un orden mayor, no de 1 sino de 2 µg/ml. En ambos estudios se utilizó como sistema de evaluación de la CIM, ensayos de dilución en medio líquido.

El gen *mcr-1*, secuenciado mostró 100% de identidad con el reportado por Liu (67). Del total de aislamientos positivos para *mcr-1*, 27 de éstos producen BLEE ya sea CTX-M o AmpC y determinantes PMQR. Además, como mencionamos anteriormente los mecanismos responsables de la resistencia observada, fueron variantes de los grupos CTX-M-2 en su mayoría, CTX-M14 y CMY-2. Esto difiere de lo reportado por Fernandes *y col.*, (203) donde los aislamientos portaban enzimas de los grupos CTX-M-1, CTX-M-8 y CTX-M15.

La resistencia colistina fue exitosamente transferida por conjugación tanto utilizando como receptora a *E. coli* j53 como a *Salmonella* M1744, donde no se observó transferencia de resistencia a C3G, pero si se observó co-transferencia del determinante *qnrB5* en los aislamientos portadores. Aislamientos de *E.coli* de origen humano, confiriendo solo resistencia a colistina pero a no a C3G, fueron reportado por Rapoport *y col* (76). Pero existen reportes de co-transferencia de *bla*<sub>CTX-M-55</sub> junto con *mcr-1* en único plásmido de *S. enterica* recuperado de pollos enfermos (204). Hasta el momento, no existen reportes de co-transferencia de determines de resistencia tipo PMQR.

El gen *mcr-1* ha sido asociado hasta ahora con diferentes replicones, como IncI2, IncHI2, IncP, IncFIB y IncX4 (67, 205-208). En este trabajo, se realizó PCR para determinar el grupo de incompatibilidad tanto en las cepas dadoras como las transconjugantes obtenidas, y en ambos aislamientos las reacciones fueron positivas a varios replicones diferentes. En un solo transconjugante, se pudo confirmar con certeza el replicón IncK, entre otros. No se han reportado hasta el presente estudio, plásmidos conteniendo este replicón albergando el gen *mcr-1*, en aislamientos de *E. coli* recuperadas de animales.

Es relevante destacar que fue descrito en este trabajo, el sistema toxina-antitoxina *pemK* y *ccdA-B*, en los transconjugantes obtenidos. Ambos sistemas TA podrían estar implicados en el mantenimiento y estabilidad del plásmido portador del gen *mcr-1*. Al día de la fecha no existen registros a cerca de la presencia de estos sistemas TA descritos.

# Conclusiones

Esta tesis provee información, por primera vez en el país, de los mecanismos de resistencia transferibles existentes en las bacterias presentes en animales de consumo, probablemente asociados al uso de elevadas cantidades de antimicrobianos en la producción. En un momento en que los organismos nacionales e internacionales muestran seria preocupación por el alarmante incremento de la resistencia a antimicrobianos, resulta esencial contar con información que provea las bases para cualquier medida que contribuya a su control, y que no impacte negativamente en la producción animal ni la economía de un país.

El trabajo desarrollado y los resultados de esta tesis lograron que se participara en la Comisión que elaboró el plan “Estrategia Argentina para el Control de la Resistencia a Antimicrobianos”, bajo la coordinación de la Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios del Ministerio de Salud durante el año 2015.

### *Salmonella* spp.

- ✓ Los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados de bovinos y equinos mostraron altos niveles de sensibilidad a C3G, fluoroquinolonas, carbapenemes y colistina. Las dos poblaciones analizadas mostraron bajos niveles de sensibilidad a TET y SXT.
- ✓ El análisis de la región QRDR de estos aislamientos de *Salmonella* con fenotipo de resistencia a NAL y sensibilidad disminuida a CIP y a ENR, arrojó sustituciones en GyrA y ParC anteriormente descriptas.
- ✓ Se describió por primera vez la detección de CMY-2 en un único aislamiento de *S. Typhimurium* con resistencia a C3G recuperado de equino. Este aislamiento fue portador de un plásmido conjugativo de grupo de incompatibilidad IncI1 cuyo tamaño fue estimado en 100 Kb.
- ✓ Se caracterizó la plataforma genética donde se encontró *bla*<sub>CMY-2</sub> en *S. Typhimurium* y parte del entorno genético determinado (*IS1294b-ΔISEcp1-bla*<sub>CMY-2</sub>) fue diferente al compararlo con aislamientos de diferentes especies procedentes de animales y humanos.

- ✓ Dicho arreglo fue confirmado al secuenciar el plásmido completo pST10-16. También se identificaron los módulos involucrados en la transferencia y diseminación. Se determinó el secuenciotipo de pST10-16 (*rep:1, ardA:14, trbA:3, sogS:4, pil:1*) el cual no ha sido definido hasta el momento en el esquema pMLST del grupo de IncI1. Los ST más cercanos fueron ST4, ST12, ST22 y ST144.
- ✓ *Salmonella* Heidelberg fue la serovariedad prevalente dentro de los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados de aves (55%) proveniente de diferentes granjas de dos provincias Argentinas.
- ✓ Aproximadamente el 50% de estos aislamientos de *Salmonella* spp. presentaron sensibilidad a C3G y este porcentaje de sensibilidad fue menor al evaluar NAL y CIP. El total de los aislamientos fueron sensibles a los carbapenemes y a colistina.
- ✓ El mecanismo prevalente de resistencia a C3G observado en *Salmonella* spp. fue la producción de la  $\beta$ -lactamasa AmpC CMY-2.
- ✓ Se observó una menor proporción de enzimas BLEE responsables del fenotipo de resistencia observado, todas cefotaximasas pertenecieron al grupo CTX-M-14. Estas enzimas se presentaron solas o en combinación con enzimas del grupo CTX-M-2.
- ✓ El determinante PMQR prevalente dentro de los aislamientos analizados fue *qnrB* (89,5%) y la variante alélica encontrada fue *qnrB5*. Esta variante no ha sido descrita previamente en aislamientos clínicos o veterinarios en nuestro país.
- ✓ Se observó en el 75% de los aislamientos de *S. Heidelberg* un mismo patrón de *Xba*I-PFGE (ARJF6X01.0025), que demuestra la propagación de un clon predominante entre las diferentes granjas.
- ✓ Se demostró en los aislamientos analizados la presencia de un plásmido conjugativo cuyo replicón también pertenece al grupo de incompatibilidad IncI1, con un tamaño estimado de 100 Kb. Estos plásmidos presentaron el sistema toxina-antitoxina *pndA-C* y *cca-B* involucrados probablemente en la permanencia y estabilidad de los plásmidos.

## *Escherichia coli*

- ✓ El serotipo prevalente en los aislamientos de *E. coli* STEC-no 0157 recuperados de bovinos, fue O26 y O111. La mayor proporción corresponde al genotipo *stx1*.
- ✓ El 87% de los aislamientos portadores de *stx1* contienen el determinante de virulencia *eae* (intimina), importante para la patogénesis de éstos aislamientos.
- ✓ Entre los aislamientos de *E. coli* STEC- no 0157 se observó una baja proporción de resistencia a AMP (18/69) y en todos los casos se identificó la BLEA TEM-1.
- ✓ Se observó un alto nivel de sensibilidad a las C3G ensayadas; los únicos dos aislamientos resistentes fueron caracterizados como productores de la cefalosporinasa CMY-2.
- ✓ Estos aislamientos también presentaron un elevado porcentaje de sensibilidad a quinolonas (NAL 73%, a CIP 87,3% y a ENR 84,1%) y no mostraron resistencia a carbapenemes ni a colistina.
- ✓ La presencia de resistencia a NAL y sensibilidad disminuida a CIP y ENR, se asoció a dos sustituciones en GyrA (Ser 83 y Asp87) y una en ParC (Ser80) previamente descritas.
- ✓ Dentro de los determinantes PMQR detectados en los aislamientos de *E. coli* STEC-no 0157, *qnrA* fue el prevalente. Solo las variantes *qnrS* y *qnrB* han sido encontradas.
- ✓ En los aislamientos de *E. coli* recuperados de pollos parrilleros se observó un elevado nivel de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, quinolonas y colistina. La proporción de resistencia a otras familias de antimicrobianos ensayados (SXT, TET, ST) también fue alta destacándose la descripción de un gran número de aislamientos MDR. Se observó 100% de sensibilidad a los carbapenemes.
- ✓ El mecanismo de resistencia a C3G prevalente en estos aislamientos fue la cefotaximasa CTX-M-2, presentándose algunas veces en combinación con

- CTX-M-14 o CMY-2. En dos aislamientos se observó sólo la producción de CTX-M-14 y en un aislamiento sólo la de CMY-2.
- ✓ La mayor proporción (68%) de aislamientos de *E. coli* recuperada de aves, fueron considerados como comensales (filogrupos A y B1) mientras que el resto fueron categorizados como virulentos (filogrupos B2 y D).
  - ✓ El análisis de la clonalidad de los aislamientos con resistencia a C3G reveló una distribución heterogénea de los filogrupos. No se encontró asociación entre la presencia de la enzima tipo BLEE o AmpC y el filogrupo presente.
  - ✓ Los marcadores PMQR prevalentes fueron *qnrB* (22/41) y *qnrS* (19/41), siendo las variantes alélicas identificadas como *qnrB5* y *qnrS1*. Es importante destacar que *qnrB5* no ha sido previamente descrito en Argentina ya sea en aislamientos clínicos o veterinarios.
  - ✓ En estas muestras se observó una gran diversidad de determinantes PMQR: *qnrA* (2/41), *qnrD* (3/41) y las bombas de eflujo *oqxAB* (6/11) y *qepA* (4/41). No se detectaron *qnrC* ni la variante de acetiltransferasa *aac(6)Ib-cr*.
  - ✓ Se describió un elevado porcentaje de aislamientos con resistencia a COL (76%) y se detectó el gen *mcr-1* en todos los aislamientos resistentes.
  - ✓ Se demostró que el determinante de resistencia *mcr-1*, se halla localizado en un plásmido conjugativo.
  - ✓ No se observó la co-transferencia de mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. Se detectó la co-transferencia del determinante *qnrB5* en los aislamientos portadores, sugiriendo que comparte una localización en el mismo plásmido.
  - ✓ Al evaluar los grupos de incompatibilidad plasmídicos en las cepas salvajes y los transconjugantes obtenidos, se identificó al grupo IncK como el posible replicón que caracteriza al plásmido conjugativo portador del determinante de resistencia *mcr-1*.

# Anexo

## Tablas

**Tabla 1: LISTA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS IMPORTANTES PARA LA MEDICINA VETERINARIA**

Las especies animales en las que se usan los agentes antimicrobianos se abrevian de las siguientes formas:

**AVI:** aves; **API:** abejas; **BOV:** bovinos; **CAP:** caprinos; **CAM:** camélidos; **EQU:** équidos; **LEP:** conejos; **OVI:** ovinos; **PIS:** peces; **SUI:** suidos.

**AVIC:** agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica

**AVMI:** agentes antimicrobianos veterinarios de importancia elevada

**AVI:** agentes antimicrobianos veterinarios de importancia

Agentes Antimicrobianos (Clase, subclase, sustancia)	Especie	Observaciones específicas	AVIC	AVMI	AVI
AMINOCUMARINAS		Se usa para el tratamiento local de mastitis y para las septicemias de los peces.			X
Novobiocina	BOV,CAP,OVI,PIS				
AMINOGLUCÓSIDOS		La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a los aminoglucósidos en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.  Los aminoglucósidos son importantes para las septicemias, las enfermedades digestivas, respiratorias y urinarias.	X		
Espectinomicina	AVI,BOV,CAP,EQU, LEP, OVI, PIS, SUI				
Estreptomina	API, AVI,BOV,CAP,EQU, LEP,OVI,PIS, SUI				
Dihidroestreptomina	AVI, BOV,CAP, EQU, LEP,OVI, SUI				
AMINOGLUCÓSIDOS + 2 DEOXIESTREPTAMINA		La gentamicina está indicada para las infecciones debidas a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , con pocas alternativas.			
Kanamicina	AVI,BOV,EQU, PIS, SUI				
Neomicina	API, AVI, CAP, EQU, LEP,OVI,SUI				
Framicetina	BOV, CAP, OVI				
		La apramicina y la fortimicina, solo se usan en animales. Se dispone de pocas			

Paromomicina	AVI, BOV, CAP, OVI, LEP, SUI	alternativas económicas.			
Apramicina	AVI, BOV, LEP, OVI, SUI				
Fortimicina	AVI, BOV, LEP, OVI, SUI				
Gentamicina	AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Tobramicina	EQU				
Amikacina	EQU				
<b>ANFENICOLES</b>		Los fenicoles son agentes importantes para la medicina veterinaria.	<b>X</b>		
Florfenicol	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	<b>Son importantes para tratar enfermedades de los peces, para las que existen pocas alternativas de tratamiento.</b>			
Tainfenicol	AVI, BOV, CAP, OVI, PIS, SUI	Representan una alternativa útil para las infecciones respiratorias de los bovinos, los suidos y las aves de corral.  El florfenicol se usa para tratar la pasteurelosis en los bovinos y los cerdos.			
<b>ANSAMICINA-RIFAMICINAS</b>		Esta clase de agentes solo está autorizada en algunos países y con un número de indicaciones muy limitado (mastitis) y existen pocas alternativas disponibles.	<b>X</b>		
Rifampicina	EQU				
Rifaximina	BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI	<b>La rifampicina es esencial para el tratamiento de infecciones por <i>Rhodococcus equi</i> en los potros. Sin embargo, solo está disponible en unos pocos países.</b>			
<b>ARSENIALES</b>		Se emplean para luchar contra la coccidiosis intestinal parasitaria (Eimeria spp.)			
Roxarsona	AVI, SUI				<b>X</b>
Nitarsona	AVI, SUI				
<b>BICICLOMICINA</b>		Figura en la lista de enfermedades digestivas y respiratorias de los bovinos y para las septicemias de los peces.			<b>X</b>
Bicozamicina	AVI, BOV, PIS, SUI				
<b>CEFALOSPORINAS</b>		Las cefaloporinas se usan para el tratamiento de septicemias, de		<b>X</b>	

<b>CEFALOSPORINAS DE PRIMERA GENERACIÓN</b>		infecciones respiratorias y de las mastitis.			
Cefacetil	BOV				
Cefalexina	BOV, CAP, EQU, OVI, SUI				
Cefalotina	EQU,				
Cefapirina	BOV				
Cefazolina	BOV, CAP, OVI				
Cefaloium	BOV, CAP, OVI				
<b>CEFALOSPORINAS DE SEGUNDA GENERACIÓN</b>					
Cefuroxima	BOV				
<b>CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN</b>		La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a <b>las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.</b>			
Cefoperazona	BOV, CAP, OVI				
Ceftiofur	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Ceftriaxona	AVI, BOV, OVI, SUI	Se usan para el tratamiento de septicemias, de las infecciones respiratorias y de las mastitis.	<b>X</b>		
<b>CEFALOSPORINAS DE CUARTA GENERACIÓN</b>					
Cefquinoma	BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI	Las alternativas tienen una eficacia limitada debido a un espectro inadecuado o a la presencia de resistencia a los agentes antimicrobianos.			
<b>ÁCIDO FUSÍDICO</b>		Se emplea en el tratamiento de las enfermedades oftalmológicas de los bovinos y los caballos.		<b>X</b>	
Ácido fusídico	BOV, EQU				
<b>IONÓFOROS</b>		Son esenciales para la salud animal, porque se usan para luchar contra la coccidiosis intestinal parasitaria ( <i>Eimeria</i> spp.), para la que hay pocas o ninguna alternativa disponible.			
Lasalocid	AVI, BOV, LEP, OVI				
Maduramicina	AVI	<b>Son de importancia crítica en aves de corral.</b>		<b>X</b>	
Monensina	API, AVI, BOV, CAP				
Narasina	AVI, BOV	<b>Actualmente, esta clase solo se usa</b>			

Salinomicina	AVI, LEP, BOV, SUI	en animales.			
Semduramicina	AVI				
LINCOSAMIDAS		Son esenciales para el tratamiento de la neumonía causada por micoplasmas, la artritis infecciosa y la enteritis hemorrágica de los cerdos.		X	
Pirlimicina	BOV,SUI, AVI				
Lincomicina	API, AVI, BOV, CAP,OVI,PIS,SUI				
MACRÓLIDOS (C hace referencia a la estructura química)		<p>La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a los macrólidos en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.</p> <p>Los macrólidos se usan para tratar las infecciones por micoplasmas en los cerdos y las aves de corral, la enfermedad hemorrágica dogestiva en los cerdos (<i>Lawsonia intracellularis</i>) y los abscesos del hígado (<i>Fucobacterium necrophorum</i>) en los bovinos, cuando existen pocas alternativas.</p> <p>También se usan las macrólidos para las infecciones respiratorias de los bovinos.</p>			
MACRÓLIDOS C14					
Eritromicina	API, AVI, BOV, CAP,EQU, LEP,OVI, PIS, SUI				
Oleandomicina	BOV				
MACRÓLIDOS C15					
Gamitromicina	BOV				
Tulatromicina	BOV, SUI				
MACRÓLIDOS C16					
Carbomicina	AVI				
Josamicina	AVI, PIS,SUI			X	
Kitasamicina	AVI, PIS,SUI				
Espiramicina	AVI, BOV, CAP,EQU, LEP,OVI, PIS, SUI				
Tilmicosina	AVI, BOV, CAP,EQU, LEP,OVI, SUI				
Tilosina	API, AVI, BOV, CAP,LEP,OVI, SUI				
Mirosamicina	API, AVI, PIS,SUI				
Terdecamicina	AVI, SUI				
Tildipirosina	BOV,SUI				
Tilvalosina	AVI, SUI				

MACRÓLIDOS C17					
Sedecamicina	SUI				
ORTOMICINAS		Se usa para las enfermedades digestivas de las aves de corral y los conejos.			X
Avilamicina	AVI, LEP	Actualmente, esta clase solo se usa en animales.			
PENICILINAS					
PENICILINAS NATURALES (incluidas esteres y sales)					
Benethamine penicilina	BOV				
Bencilpenicilina	AVI, BOV,CAM, CAP,EQU, LEP,OVI,SUI	<b>Actualmente, penetamato (iohidrato) solo se usa en animales.</b>			
Penetamato (iohidrato)	BOV	La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a las penicilinas en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.			
Bencilpenicilina procaína/ Penicilina Benzatina	BOV, CAM. CAP, EQU, OVI, SUI	Se las usa para el tratamiento de las septicemias, y de las infecciones respiratorias y de las vías urinarias.			
AMDINOPENICILINAS					
Mecilinam					
AMINOPENICILINAS					
Amoxicilina	AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, PIS, SUI				
Ampicilina	AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, PIS, SUI				
Hetacilina	BOV				
AMINOPENICILINAS + INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS		Esta clase es importante para el tratamiento en una amplia gama de especies animales.			
Amoxicilina+ Ácido clavulánico	AVI, BOV, CAP, EQU, OVI, SUI	Se disponen de pocas alternativas económicas.			
Ampicilina+ Sulbactam	AVI, BOV, SUI				
CARBOXIPENICILINAS					

Ticarcilina	EQU			
Tobicilina	PIS			
UREIDOPENICILINAS				
Aspoxicilina	BOV, SUI			
FENOXIPENICILINAS				
Fenoximetilpenicilina	AVI, SUI			
Feneticilina	EQU			
PENICILINAS ANTIESTAFILOCOCCOS				
Cloxacilina	BOV, CAP, EQU, OVI, SUI			
Dicloxacilina	BOV, CAP,OVI, AVI, SUI			
Nafcilina	BOV, CAP,OVI			
Oxacilina	BOV, CAP,EQU, OVI, AVI,SUI			
ÁCIDO FOSFÓNICO				
Fosfomicina	AVI, BOV, PIS, SUI	Es esencial para el tratamiento de infecciones de los peces, para los que existen pocas alternativas de tratamiento. Sin embargo, solo está disponible en unos pocos países.		X
PLEUROMUTILINAS				
Tiamulina	AVI, CEP, LEP, OVI, SUI	Es esencial contra las infecciones respiratorias de los cerdos y las aves de corral.		X
Valnemulina	AVI, SUI	Es de importancia crítica contra la disentería de los suidos ( <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> ). Sin embargo, está disponible solo en algunos países.		X
POLIPEPTIDOS				
Enramicina	AVI, SUI	La bacitracina se usa contra la enteritis necótica en aves de corral.		X
Gramicidina	EQU	Esta clase está indicada para las septicemias, colibacilosis, salmonelosis e infecciones urinarias.		
Bacitracina	AVI, BOV, LEP, SUI, OVI	Los polipéptidos cíclicos se usan para las infecciones digestivas de gram negativas.		
POLIP. CÍCLICOS				

Colistina	AVI, BOV,CAP, EQU, LEP, OVI, SUI			
Polimixina	BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, AVI			
<b>QUINOLONAS</b>				
QUINOLONAS PRIMERA GENERACION				
Flumequina	AVI, BOV,CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	Las quinolonas de primera generaci3n se usan para el tratamiento de septicemias e infecciones, tales como la colibacilosis.		X
Miloxacina	PIS			
3cido nalid3xico	BOV			
3cido oxol3nico	AVI, BOV, LEP, PIS, SUI, OVI			
QUINOLONAS PRIMERA GENERACION (FLUOROQUINOLONAS)				
Ciprofloxacina	AVI, BOV, SUI	La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a las fluoroquinolonas en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.  Las fluoroquinolonas tienen una importancia cr3tica para el tratamiento de septicemias, e infecciones respiratorias y digestivas.		X
Danofloxacina	AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI			
Difloxacina	AVI, BOV, LEP, SUI			
Enrofloxacina	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI			
Marbofloxacina	AVI, BOV, EQU, LEP, SUI			
Norfloxacina	AVI, BOV, CAP, LEP, OVI, SUI			
Ofloxacina	AVI, SUI			
Orbifloxacina	BOV, SUI			
Sarafloxacina	PIS			
QUINOXALINAS				
Carbadox	SUI			
Olaquindox	SUI			

SULFONAMIDAS					
Sulfaclopiridazina	AVI, BOV, SUI				
Sulfadiazina	AVI, BOV, CAP, OVI, SUI				
Sulfadimetoxina	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI				
Sulfadimidina (Sulfametazina, Sulfadimerazina)	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Sulfadixina	BOV, EQU, OVI, SUI				
Sulfafurazol	BOV, PIS				
Sulfaguanidina	AVI, CAP, OVI				
Sulfamerazina	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI				
Sulfadimetoxazol	AVI, BOV, SUI				
Sulfametoxina	AVI, PIS, SUI				
Sulfamonometoxina	AVI, PIS, SUI				
Sulfanilamida	AVI, BOV, CAP, OVI				
Sulfapiridina	BOV, SUI				
Ftalilsulfatiazol	SUI				
Sulfaquinoxalina	AVI, BOV, CAP, LEP, OVI				
SULFONAMIDAS + DIAMINOPIRIMIDINAS					
Sufametoxipiridazina	AVI, BOV, EQU, SUI				
Ormetoprima+ Sulfametoxina	PIS				
Trimetoprima+ Sulfonamida	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI				
DIAMINOPIRIMIDINAS					
Baquiloprima	BOV, SUI				

La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a las sulfonamidas en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.

**La diferentes clases, solas o combinadas, tienen una importancia crítica para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades (infecciones de origen bacteriano, coccidial y protozoario) de numerosas especies animales.**

X

Trimetoprima	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Ormetoprima	AVI				
<b>ESTREPTOGRAMINAS</b>		La virginiamicina es un agente antimicrobiano importante para la prevención de la enteritis necrótica ( <i>Clostridium perfringens</i> ).			<b>X</b>
Virginiamicina	AVI, BOV, OVI, SUI				
<b>TETRACICLINAS</b>		La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a las tetraciclinas en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria.			
Clortetraciclina	AVI, BOV, CAP, EQU, LEP, OVI, SUI				
Doxiciclina	AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	Es importante para el tratamiento de numerosas enfermedades bacterianas y clamidias, en una amplia gama de especies de animales.	<b>X</b>		
Oxitetraciclina	API, AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI				
Tetraciclina	API, AVI, BOV, CAM, CAP, EQU, LEP, OVI, PIS, SUI	Esta clase tiene importancia crítica para el tratamiento de animales contra cowdriosis ( <i>Ehrlichia ruminantium</i> ) y la anaplasmosis ( <i>Anaplasma marginale</i> ) debido a la falta de alternativas antimicrobianas.			
<b>TIOSTREPTONA</b>		Esta clase se usa en el tratamiento de ciertas afecciones dermatológicas.			<b>X</b>
Nosiheptida	AVI, SUI				

**Tabla 2:** Carga de los discos de antimicrobianos, puntos de corte para difusión en medio sólido y puntos de corte para dilución en medio líquido (CIM). Propuestos por el CLSI (32, 92)

Antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de zona (mm)			Criterio Interpretativo MIC (µg/ml)		
		S	I	R	S	I	R
Ampicilina (AMP)	10 µg	≥17	14-16	≤13	≤8	16	≥32
Amoxicilina/Ac.clav (AMC)	20/10 µg	≥18	14-17	≤13	≤8/4	16/8	≥32/16
Cefalotina (CEP)	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
Cefepime (FEP)	30 µg	≥25	19-24	≤18	≤2	4-8	≥16
Cefotaxima (CTX)	30 µg	≥26	23-25	≤22	≤1	2	≥4
Ceftriaxona (CRO)	30 µg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Cefoxitina (FOX)	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
Cefuroxima (CXM)	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≥21	18-20	≤17	≤4	8	≥16
Cefuroxima (CXM)	30 µg	≥23	15-22	≤14	≤4	8-16	≥32
Aztreonam (AZT)	30 µg	≥21	18-20	≤17	≤4	8	≥16
Imipenem (IMI)	10 µg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Meropenem (MER)	10 µg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Gentamicina (GEN)	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
Amicacina (AMI)	30 µg	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64
Kanamicina (KA)	30 µg	≥18	14-17	≤13	≤16	32	≥64
Tetraciclina (TET)	30 µg	≥15	12-14	≤11	≤4	8	≥16
Levofloxacin (LEV)	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4
Ciprofloxacina* (CIP)	5 µg	≥31	21-30	≤20	≤0.06	0.12-0.5	≥1
Pefloxacin (PEF)	5 µg	≥24	-	≤23	-	-	-
Ácido nalidíxico (NAL)	30 µg	≥19	14-18	≤13	≤16	-	≥32
Trimetoprima-sulfametoxazol (SXT)	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10	≤2/38	-	≥4/76
Cloranfenicol (CLR)	30 µg	≥18	13-17	≤12	≤8	16	≥32
Enrofloxacin (ENR)	5 µg	≥23	17-22	≤16	≤0.5	1-2	≥4
Ceftiofur (CFT)	30 µg	≥21	18-20	≤17	≤2	4	≥8
Colistina (COL)**	10 µg	≥11	-	≤10	-	-	-

Ciprofloxacina\*: para este antimicrobiano los puntos de corte cambian en el caso de *Salmonella spp.*

Colistina\*\*: para los valores de corte de CIM se tienen en cuenta los lineamientos establecidos por EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- version 6.0) que considera un aislamiento resistente a colistina cuando la CIM es > 2 µg/ml. Abreviaturas: **S**-sensible, **I**-Intermedio, **R**- resistente.

**Tabla 3:** Código de aminoácidos

<i>Aminoácido</i>	<i>Tres letras</i>	<i>Una letra</i>	<i>Tipo de aminoácido</i>
<i>Alanina</i>	Ala	A	No polar
<i>Arginina</i>	Arg	R	Básico
<i>Asparagina</i>	Asn	N	Polar
<i>Aspártico, ácido</i>	Asp	D	Ácido
<i>Cisteína</i>	Cys	C	Polar
<i>Fenilalanina</i>	Phe	F	No polar
<i>Glutámico, ácido</i>	Glu	E	Ácido
<i>Glutamina</i>	Gln	Q	Polar
<i>Glicina</i>	Gly	G	No polar
<i>Histidina</i>	His	H	Básico
<i>Isoleucina</i>	Ile	I	No polar
<i>Leucina</i>	Leu	L	No polar
<i>Lisina</i>	Lys	K	Básico
<i>Metionina</i>	Met	M	No polar
<i>Prolina</i>	Pro	P	No polar
<i>Serina</i>	Ser	S	Polar
<i>Tirosina</i>	Tyr	Y	Polar
<i>Treonina</i>	Thr	T	Polar
<i>Triptofano</i>	Trp	W	No polar
<i>Valina</i>	Val	V	No polar

## Protocolos experimentales

### Buffers y soluciones necesarias para las extracciones de Kado y Liu.

#### Solución de Lisis

- 3% de SDS
  - 50 mM de TRIS
- pH 12,6: llevar a pH con NaOH 2N (se añadió 1,5 ml aprox.)  
Volumen final: 100 ml (llevar a volumen con agua destilada)  
Esterilización por filtración (membrana con poros de 0,2  $\mu$ m)

#### Buffer E

- 40 mM TRIS-acetato
  - 2mM de sodio-EDTA
- pH 7,9: Llevar a pH con ácido acético glacial  
Esterilización en autoclave.

(El buffer E es en composición igual al buffer TAE, lo que varía es el pH. En su reemplazo se puede utilizar buffer TAE 1X estéril)

Fenol-cloroformo-isoámilico (24:24:1).

ClNa, 5M

Etanol al 96% calidad analítica.

### PROTOCOLO ELECTROPORACIÓN

1. A partir de un cultivo ON de la cepa adecuada (*E. coli* Dh5 $\alpha$ , por ejemplo) realizar una dilución 1/100 en caldo LB (3 ml de cultivo en 300 ml de caldo LB).
2. Incubar a 37° C hasta obtener una densidad óptica de 0,6 unidades de absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm ( $DO_{\lambda 600}$ ).
3. Centrifugar 5 minutos a 6500 rpm a 4°C en centrifuga SORVALL
4. Realizar dos 2 lavados con agua milliQ fría estéril. Centrifugar entre cada lavado.
5. Realizar 1 lavado con glicerol al 10% frío y volver a centrifugar como antes.
6. Resuspender el sedimento bacteriano obtenido con 600  $\mu$ l de glicerol al 10%.

7. Rotular y alicuotar en tubos eppendorf de 0.5 ml, de a 50  $\mu$ l de las células obtenidas.
8. Conservar hasta utilizar en freezer de -70°C.

\*Para la electroporación usar 40  $\mu$ l de células + x de plásmido/ligación.

Dar un pulso de 2.5 volts (KV) y recuperar en 1ml de TSB o 2XYT durante 1 hs a 37°C, centrifugar y sembrar por extensión en el medio TSA suplementado con el antibiótico adecuado.

#### **PREPARACION DE CONOS DE AGAROSA PARA DESALINACION DE LAS REACCIONES DE LIGACION.**

1. Combinar los siguientes reactivos:
  - 0.9 gr de glucosa
  - 0.5 gr de agarosa
  - 50 ml. de agua
2. Disolver suavemente en microondas, hasta que la solución se encuentre totalmente líquida y transparente. Mantener la solución a 50°C.
3. Colocar 800  $\mu$ l de la solución en un tubo de eppendorf de 1.5 ml para cada reacción de desalinización.
4. Colocar un tubo eppendorf de 0.5ml en la parte superior de la solución de agarosa-glucosa fundida. Presionar suavemente.
5. Esperar hasta que la agarosa solidifique y sacar el tubo suavemente del agarosa solidificada con un movimiento giratorio, obteniendo una cavidad cóncava dentro del agarosa solidificada.
6. Agregar la cantidad de plásmido que se desalar en la superficie del agarosa utilizando un tips.
7. Incubar 1 horas en baño de hielo. La sal de la ligación difundirá en la agarosa-glucosa.
8. Transferir la reacción de ligación dentro de un tubo eppendorf, utilizando un tip con extremo grande, y conservar a 4°C hasta el momento de utilización. Desechar el cono de agarosa utilizado.

## Protocolo de electroforesis en campo pulsado (PFGE) para el análisis de enterobacterias.

Protocolo propuesto por Miranda *y col.*, (209)

### Preparación de Tacos de agarosa (*plugs*):

- 1- Se inoculó una colonia a partir de un cultivo en placa de 18-24 horas de incubación, en 5 ml de caldo Infusión cerebro corazón (BHI) y se incubó *overnight* a 37°C sin agitación.
- 2- Se colocó 1 ml de cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos
- 3- Se descartó el sobrenadante con pipeta automática y se resuspendió el *pellet* bacteriano en 1 ml de PIV. Se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante.
- 4- Se resuspendió el *pellet* bacteriano en 200 µl de PIV (considerar que este volumen inicial es de 210 µl).
- 5- Se colocó 5 µl de la suspensión bacteriana en una cubeta descartable conteniendo 1 ml de PIV (dilución 1:200). Se cubrió la cubeta con parafilm y se homogenizó por inversión.
- 6- Se midió la densidad óptica en espectrofotómetro a 620 nm (DO<sub>620</sub> nm), empleando PIV como blanco (debería estar 0.05-0.15). Se calculó el volumen de PIV necesario a agregar a la suspensión bacteriana para alcanzar una DO de 5 unidades

$$*Vol. PIV a agregar (\mu l) = (DO_{medida} \times 40 \times 210) -$$

\*La fórmula proviene de:

$$DO_{final} \times Vol._{final} = DO_{inicial} \times Vol._{inicial}$$

$$5 \times (Vol._{inicial} + Vol._{agregado}) = (DO_{medida} \times 200) \times 210$$

$$+ Vol._{agregado} = [DO_{medida} \times 200 \times 210] / 5 - 210$$

Tabla: Dilución con PIV según DO obtenida

DO medida	Volumen PIV a agregar (µl)	Volumen Final (µl)
<0.05	concentrar	-
0.05	210	420
0.07	378	588
0.09	546	756
0.11	714	924

<b>0.13</b>	882	1092
<b>0.15</b>	1050	1260
<b>&gt;0.15</b>	Hacer dilución en otro tubo	-

- 7- Se limpiaron los vidrios para preparación de los *plugs* con alcohol 70%. Se transfirió 150 µl de la suspensión bacteriana ( $DO_{620} = 5$  unidades) a un eppendorf de 1.5 ml y se incubó por 10 minutos a 50°C.
- 8- Se agregó a la suspensión bacteriana, 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1.6% precalentada a 50°C y se mezcló rápidamente con vortex. Se adicionó la mezcla en los moldes para los *plugs* y se dejó solidificar a T° ambiente.
- 9- Los moldes se refrigeraron a 4° C durante 45 minutos.

#### **Lisis de las células en los *plugs* de agarosa:**

- 10- Se removieron cuidadosamente los *plugs* con ansa descartable y se colocaron en tubos de 15 ml conteniendo 1 ml de *Buffer* de Lisis. Se incubó a 37°C *overnight*.
- 11- Se reemplazó el *Buffer* de Lisis por *Buffer* ES-P. Se incubaron los *plugs* a 50°C durante 24 horas.

#### **Lavados de *plugs* de agarosa:**

- 12- Se lavaron los *plugs* con *Buffer* TE 1X para eliminar la proteínasa K. Realizar este procedimiento al menos 5 veces, dejando actuar cada lavado durante 30 minutos con agitación horizontal.  
Los *Plugs* se pueden conservar a 4°C, hasta 3-4 meses.

#### **Equilibrio y digestión de *plugs* con S1 nucleasa:**

- 13- Se equilibraron los *plugs* con 300 µl del *Buffer* 1X apropiado para la enzima de restricción a utilizar. En este caso S1 nucleasa. Incubar a T° ambiente durante 2-3 horas.
- 14- Se añadió 10 U/ µl de S1 nucleasa y se incubó durante 18 horas a la T° recomendada por el proveedor.
- 15- Se colocaron los *plugs* dentro del gel de corrida (agarosa para PFGE al 0,8 % o 1X en *Buffer* TBE 1X )
- 16- La corrida del gel se realizó con pulsos de 5 a 60 segundos durante 20 horas a 200 Volts.

### **Interpretación de patrones de bandas:**

- Un aislamiento se considera altamente relacionado a una cepa si se diferencia de esta con 2 o 3 bandas
- Un aislamiento se considera posiblemente relacionado si se diferencia por 4 a 6 bandas
- Un aislamiento se considera distinto si se diferencia por 7 o más bandas.

### **Preparación de Buffers:**

#### **Buffer PIV pH 7.6**

- 1M TRIS pH 7.6 \_\_\_\_\_ 100 ml de TRIS 5 M, pH8.0
- 1 M ClNa \_\_\_\_\_ 29,2 gr ClNa
- Agua destilada csp 500 ml.
- Esterilizar en calor húmedo en AUTOCLAVE

#### **Buffer de Lisis pH 7.6**

- 1M TRIS pH 7.6 \_\_\_\_\_ 100 ml de TRIS 5 M, pH 8.0
- 1M ClNa \_\_\_\_\_ 29,2 gr. ClNa
- 100mM EDTA pH 7.6 \_\_\_\_\_ 100 ml de EDTA 0,5 M, pH 8.0
- 0,2 % Deoxicolato-Na \_\_\_\_\_ 1 gr. Deoxicolato-Na
- 0,5 % Laurilsarcosinato-Na \_\_\_\_\_ 2,5 gr. Laurilsarcosinato-Na
- 0,5 % Brij-58 \_\_\_\_\_ 2,5 gr. Brij-58
- Agua destilada csp 500 ml.
- Esterilizar por calor húmedo en AUTOCLAVE.
- 1 mg/ml de Lisosima pH 7.6 y 50 µg/ml Ribonucleasa A, al momento de uso.

#### **Buffer ES-P**

##### *Buffer ES:*

- 0,4M EDTA \_\_\_\_\_ 74,45 gr de EDTA
- 1% laurilsarcosinato-Na \_\_\_\_\_ 5 gr de laurilsarcosinato-Na
- Pesar el EDTA y disolver en 400 ml de agua destilada. Ajustar a pH 9.0 agregando grageas de NaOH. Agregar 5 gr de laurilsarcosinato-Na. Ajustar a volumen a 500 ml con agua destilada. Esterilizar por calor húmedo en AUTOCLAVE.

*Buffer ES-P (Buffer ES + Proteínasa K\*):*

SN. Stock	<b>1 plug</b>	<b>10 plugs</b>	<b>15 plugs</b>	<b>20 plugs</b>	<b>Cn. Final</b>
<b>Buffer ES</b>	1 ml	10 ml	15 ml	20 ml	1 X buffer ES
<b>Proteínasa K</b>	0,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg	0,5 mg/ml P. K

Preparar al momento de uso. Pesar Proteínasa K y disolver en Buffer ES.

**Buffer TE 1X pH 7.5**

- 5 mM TRIS \_\_\_\_\_ 500 µl de TRIS 5M
- 5 mM EDTA \_\_\_\_\_ 5 ml de EDTA 5 M
- pH 7.5, ajustar a 500 ml con agua destilada.

Esterilizar por calor húmedo en AUTOCLAVE.

**Buffer TBE 10X**

- TRIS base 0.89 M \_\_\_\_\_ 108 gr (pH 8.0)
- Borato 0.089 M \_\_\_\_\_ 55 gr
- 2.5 mM EDTA disódico \_\_\_\_\_ 5 ml EDTA 0.5 M
- Ajustar a 1000 ml con agua destilada

Esterilizar por calor húmedo en AUTOCLAVE.

**Solución Stock de TRIS 5 M pH 7.6**

Pesar 181, 2 gr de TRIS y agregar 200 ml de agua destilada. Ajustar a pH 8.0 por el agregado de HCl concentrado. Ajustar a volumen de 300 ml.

**Solución Stock EDTA 0.5 M pH 7.6**

Pesar 186,1 gr de EDTA (sal di sódica, PM: 372, 24), agregar 800 ml agua destilada. Mezclar y ajustar a pH 8.0 con aproximadamente 20 gr. de grageas de NaOH. Ajustar el volumen a 1000 ml con agua destilada. Esterilizar por calor húmedo en AUTOCLAVAR.

# Bibliografía

1. Davies J. Another look at antibiotic resistance. *J Gen Microbiol.* 1992;138:1553-9.
2. Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archiv Med Res.* 2005;36:697-705.
3. Gyles C, Boerlin P. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol.* 2014;51(2):328-40.
4. Kruse H, Sorum H. Transfer of Multiple Drug Resistance Plasmids between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvironments. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(11):4015-21.
5. Stokstad ELR, Jukes TH. Further observations on the "animal protein factor". *Exp Biol Med.* 1950;73(3):523-8.
6. van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47:763-71.
7. Howarth F., Poulter D. Vancomycin resistance: time to ban avorparcin. *Lancet.* 1996;347(9007):1047.
8. Piddock LJ. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J Antimicrob Chemother.* 1996;38:1-3.
9. van den Bogaard AE. Antimicrobial resistance—relation to human and animal exposure to antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:453-61.
10. Lipsitch M, Singer RS, Levin BR. Antibiotics in agriculture: When is it time to close the barn door? *Proc Nat Acad Sci.* 2002;99(9):5752-4.
11. Nakamura S. Veterinary Use of New Quinolones in Japan. *Drugs.* 1995;49(2):152-8.
12. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):117-23.
13. Briñas L, Moreno MA, Teshager T, Zarazaga M, Sáenz Y, Porrero C, et al.  $\beta$ -Lactamase Characterization in *Escherichia coli* Isolates with Diminished Susceptibility or Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins Recovered from Sick Animals in Spain. *Microbial Drug Resistance.* 2003;9(2):201-9.
14. Bradford PA, Petersen PJ, Fingerman IM, White DG. Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E.coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44:607-10.
15. Batchelor M, Threlfall JE, Liebana E. Cephalosporin resistance among animal-associated *Enterobacteria*: a current perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005;3(3):403-17.
16. Brown SA. Fluoroquinolones in animal health. *J Vet Pharmacol Therap.* 1996;19:1-14.
17. Bauditz R. Results of clinical studies with Baytril® in calves and pigs. *Vet Med Rev.* 1987;2:122-9.
18. Sumano López H, Ocampo CL, Brumbaugh GW, Lizarraga RE. Effectiveness of two fluorquinolones for the treatment of chronic respiratory disease outbreak in broilers. *Brit Poul Sci.* 1998;39(1):42-6.
19. Ziv G. Pharmacotherapeutics of antibacterial fluoroquinolones in small and large animal practice. *Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. J Antimicrob Chemother.* 1994;9:194.

20. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6:a025247.
21. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(2):116-29.
22. Tomasz A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1979;33:113-37.
23. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):160–201.
24. Kong KF, Schnepfer L, Mathee K.  $\beta$ -lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica.* 2010;118(1):1–36.
25. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(1):12-26.
26. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969–76.
27. Ambler RP. The Structure of  $\beta$ -Lactamases. *Phil Trans R Soc Lond.* 1980;289:321-31.
28. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211–33
29. Rodriguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, et al. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(12):4895-7. Epub 2004/11/25.
30. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1-14.
31. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657–86.
32. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. . CLSI document M100-S25. United States: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
33. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes:origin and diffusion. *Front Microbiol.* 2012;3(119).
34. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:33-41. Epub 2007/12/25.
35. Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(1):14-23.
36. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-82. Epub 2009/01/13.
37. Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L.  $\beta$ -Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 2007;121(3-4):197-214. Epub 2007/02/20.
38. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and

*Escherichia coli* isolates from poultry. Vet Microbiol. 2010;145(3-4):273-8. Epub 2010/04/17.

39. Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. Rev Argent Microbiol. 2010;42:49-52.

40. Costa D, Poeta P, Briñas L, Sáenz Y, Rodrigues J, Torres C. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. J Antimicrob Chemother. 2004;54(5):960-1.

41. Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in cattle, Japan. Emerg Infect Dis. 2004;10(1):69-75.

42. Riaño I, Moreno MA, Teshager T, Sáenz Y, Domínguez L, Torres C. Detection and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. J Antimicrob Chemother 2006;58(4):844-7.

43. Sabaté M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B, et al.  $\beta$ -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). J Antimicrob Chemother. 2002;49(6):989-997.

44. Ibar MP, Vigo G, Piñeyro P, Caffer MI, Quieroga P, Perfumo C, et al. Serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie enterica en porcinos de faena y su resistencia a los antimicrobianos. Rev Argent de Microbiol. 2009;41:56-162.

45. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. J Med Pharm Chem. 1962;91:1063-5.

46. Alós JI. Quinolones. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21(5):268-72.

47. Mella S, Acuña G, Muñoz M, Perez C, Labarca J, Zemelman R. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación Rev Chil Infectol. 2000;17(1):53-66.

48. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance ; interactions between human, animal, and environmental ecologies. Front Microbiol. 2012;3(24).

49. Rodríguez-Martínez J, Cano M, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother. 2011;17(2):149-82.

50. Morosini MI, Loza E, del Campo R, Almaraz F, Baquero F, Cantón R. Fluoroquinolone-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Spain: Activities of Garenoxacin against Clinical Isolates Including Strains with Altered Topoisomerases. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(8):2692-5.

51. Hooper DC. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 2000;2696(2):24-8.

52. Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. J Antimicrob Chemother. 2003;51(1):v.

53. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(2):385-92. Epub 2007/08/29.

54. Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. Microbes Infect. 2006;8(7):1937-44.

55. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(5):1109-17. Epub 2003/04/17.
56. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998;352(9105):797-9.
57. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, et al. *qnr* Gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2297-9.
58. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664-89
59. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochem.* 2014;53(10):1565-74. Epub 2014/03/01.
60. Soriano F. Selection of antibiotic-resistant bacteria: microbiological and pharmacological factors. *Med Clin (Barc).* 2001;117:632-6.
61. Canton R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):977-91. Epub 2011/07/05.
62. Martínez-Martínez L, Cano Eliecer M, Rodríguez-Martínez MJ, Calvo J, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(5):685-711.
63. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006;12(1):83-8.
64. Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem.* 2009;16(8):1028-46.
65. Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, et al. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2992-3. Epub 2008/05/21.
66. Sorensen AH, Hansen LH, Johannesen E, Sorensen SJ. Conjugative Plasmid Conferring Resistance to Olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(2):798-9.
67. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-8.
68. Falagasa ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat.* 2010;13(4-5):132-8.
69. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front in Microbiol.* 2014;5(643).
70. Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, et al. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(5):379-83. Epub 2013/10/01.
71. EMA. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health *Europ Med Ag.* 2016;EMA/231573/2016.
72. Casal J, Mateu E, W. M, M. M. Factors associated with routine mass antimicrobial usage in fattening pig units in a high pig-density area. *Vet Res* 2007;38(3):481-92.
73. Callens B, Persoons D, Maes D, Laanen M, Postma M, Boyen F, et al. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Prev Vet Med.* 2012;106(1):53-62.

74. Sun J, Li XP, Yang RS, Fang LX, Huo W, Li SM, et al. Complete Nucleotide Sequence of an IncI2 Plasmid Coharboring blaCTX-M-55 and *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(8):5014-7. Epub 2016/05/25.
75. INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Antimicrobianos. S, Laboratorio Nacional de Referencia LNR. Emergencia de resistencia plasmídica (transferible) a colistina/polimixina B. *mcr-1* en Argentina. *Boletín informativo*. 2016;3.
76. Rapoport M, Faccone D, Pasteran F, Ceriana P, Albornoz E, Petroni A, et al. First Description of *mcr-1*-Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by *Escherichia coli* in Latin America. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2016;60(7):4412-3.
77. Courvalin P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents and Chemother*. 1994;38(7):1447-51.
78. Davies J. Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science*. 1994;264:375-81.
79. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and Classification of Bacterial Plasmids. *Microbiol Rev*. 1988;52(3):375-95.
80. Filutowicz M, Burgess R, Gamelli RL, Heinemann JA, Kurenbach B, Rakowski SA, et al. Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid*. 2008;60(1):38-44. Epub 2008/05/17.
81. Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M, de la Cruz F. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol*. 2002;45(1):1-8.
82. Gomis-Rüth FX, de la Cruz F, Coll M. Structure and role of coupling proteins in conjugal DNA transfer. *Res Microbiol*. 2002;153:199-204.
83. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(6-7):298-304.
84. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005;63:219-28.
85. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microb*. 2011;301: 654- 8.
86. Leplae R, Geeraerts D, Hallez R, Guglielmini J, Dreze P, Van Melderen L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic acids research*. 2011;39(13):5513-25. Epub 2011/03/23.
87. Fozo EM, Hemm MR, Storz G. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72(4):579-89, Table of Contents. Epub 2008/12/05.
88. Blower TR, Pei XY, Short FL, Fineran PC, Humphreys DP, Luisi BF, et al. A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(2):185-90. Epub 2011/01/18.
89. Gerdes K, Christensen SK, Løbner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(5):371-82.
90. Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic acids research*. 2005;33(3):966-76. Epub 2005/02/19.

91. Cooper TF, Heinemann JA. Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12643-8. Epub 2000/11/01.
92. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility tests for Bacteria isolated from animals, Approved Standard-Third Edition CLSI Document M31-A3. United State: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
93. RED Whonet A. Protocolo de Trabajo Red Whonet-Argentina. Córdoba 2014.
94. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*. 1981;145(3):1365-73.
95. Bertona E, Radice M, Rodriguez CH, Barberis C, Vay C, Famiglietti A, et al. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a las cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacter* spp. *Rev Argent Microbiol*. 2005;37(203-208).
96. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, et al. *bla*<sub>(CTX-M)</sub> genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1319-22. Epub 2005/03/29.
97. Geser N, Stephan R, Hächle H. Occurrence and characteristics of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res*. 2012;8(21).
98. Pérez-Pérez JF, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2153-62.
99. Cejas D, Caniglia LF, Quinteros M, Giovanakis M, Vay C, Lascialandare S, et al. Plasmid-Encoded AmpC (pAmpC) in *Enterobacteriaceae*: epidemiology of microorganisms and resistance markers. *Rev Argent Microbiol*. 2012;44:182-6.
100. Eaves DJ, Liebana E, Woodward MJ, Piddock LJV. Detection of *gyrA* Mutations in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica* by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. *J of Clin Microbiol*. 2002;40(11):4121-5.
101. Jacoby GA, Griffin CM, Hooper DC. *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* Alleles. *Antimicrobial Agents and Chemother*. 2011;55(11):4979-84. Epub 2011/08/17.
102. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:394-7.
103. Rincon Cruz G, Radice M, Sennati S, Pallecchi L, Rossolini GM, Gutkind G, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013:1-4.
104. Minghua W, Qinglan G, Xu X, Wang X, Xinyu Y, Wu S, et al. New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, *qnrC*, Found in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(5):1892-7.
105. 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.
106. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(11):3953-5

107. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. oqxAB Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2009;53(8):3582-4.
108. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and environ Microbiol.* 2000;66(10):4555-8.
109. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research.* 1991;19(24):6823 -31.
110. González-Sanz R, Herrera-León S, de la Fuente M, Arroyo M, Echeita MA. Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC-type  $\beta$ -lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:1181-6.
111. Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, et al. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS pathogens.* 2012;8(6):e1002776.
112. O'Farrell B, Haase JK, Velayudhan V, Murphy RA, Achtman M. Transforming microbial genotyping: a robotic pipeline for genotyping bacterial strains. *PloS one.* 2012;7(10):e48022. Epub 2012/11/13.
113. Sidjabat HE, Yong SK, Coleman L, Sartor A, Derrington P, Heney C, et al. Expansive spread of IncI1 plasmids carrying bla<sub>CMY-2</sub> amongst *Escherichia coli*. *Int J Antimicrobial Agents.* 2014;44(3):203-8.
114. Van Bost S, Jacquemin E, Oswald E, Mainil J. Multiplex PCRs for Identification of Necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *J of Clin Microbiol.* 2003;41(9):4480-2.
115. Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. Multiplex PCR for Enterotoxigenic, Attaching and Effacing, and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Calves. *J Clin Microb.* 1998;36(6):1795-7.
116. Mnif B, Vimont S, Boyd A, Bourit E, Picard B, Branger C, et al. Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1599-603. Epub 2010/05/29.
117. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of Prokariotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology New York 2004.
118. Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2009;9(5):996-1005. Epub 2009/04/28.
119. Grimont P, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* servovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella.* 2008:1-167.
120. CCD. Centers for Disease Control and Prevention. Reports of Selected Salmonella Outbreak Investigations. Estados unidos: U.S Departament Of Health and Human Services; 2014.
121. Michanie S. Salmonella en alimentos. Cambio en el paradigma. La alimentación Latinoamericana. 2015;319:1-17.
122. M. BA, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20.
123. Magoč Tanja, Salzberg Steven L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* 2011;27(21):2957-63.

124. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 2009;10(3):R25.
125. Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, Dew IM, Fasulo DP, Flanigan MJ, et al. A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science*. 2000;287(5461):2196-204.
126. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19(5):455-77.
127. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom*. 2008;9(75).
128. Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(6):1229-33. Epub 2008/03/28.
129. Grant JR, Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic acids research*. 2008;36(Web Server issue):W181-4. Epub 2008/04/16.
130. Marrero-ortiz R, Han J, Lynne AM, David DE, Stemper ME, Farmer D, et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars isolated from dairy cattle in Wisconsin. *Food Microbiol Int*. 2012;45(2):962-7.
131. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlslose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8(8):887-900. Epub 2011/04/16.
132. Foley SL, Nayak R, Hanning IB, Johnson TJ, Han J, Ricke SC. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Applied and environ Microbiol*. 2011;77(13):4273-9. Epub 2011/05/17.
133. Quesada A, Reginatto GA, Ruiz Español A, Colantonio LD, Burrone MS. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Rev Per Med Exper S Pub*. 2016;33(1):32.
134. Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tung Tran, et al. Differential Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria with Unusual Phenotypes of Quinolone Susceptibility from Argentina. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2013;57(6):2467-75.
135. Piddock LJ, Ricci V, McLaren I, Griggs DJ. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 1998;41:635-41.
136. Ruiz J, Castro D, Goni P, Santamaria JA, Borrego JJ, Vila J. Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium. *J Med Microbiol*. 1997;46:623-8.
137. Cavaco LM, Korsgaard H, Sorensen G, Aarestrup FM. Plasmid-mediated quinolone resistance due to *qnrB5* and *qnrS1* genes in *Salmonella enterica* serovars Newport, Hadar and Saintpaul isolated from turkey meat in Denmark. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(3):632-4. Epub 2008/05/23.
138. Gonzalez F, Araque M. Association of Transferable Quinolone Resistance Determinant *qnrB19* with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Salmonella* Give and

- Salmonella* Heidelberg in Venezuela. Int J Microbiol. 2013;2013:628185. Epub 2013/11/05.
139. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, et al. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. J Antimicrob Chemother. 2011;66(6):1278-86. Epub 2011/03/12.
140. Veeraraghavan B, Anandan S, Sethuvel DP, Ragupathi NK. Pefloxacin as a Surrogate Marker for Fluoroquinolone Susceptibility for *Salmonella typhi*: Problems and Prospects. J Clin Diagn Res. 2016;10(8):DL01-2. Epub 2016/09/23.
141. Skov R, Matuschek E, Sjölund-Karlsson M, Åhman J, Petersen A, Stegger M, et al. Development of a Pefloxacin Disk Diffusion Method for Detection of Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella enterica*. J of Clin Microbiol. 2016;11(53):11.
142. Donado-Godoy P, Gardner I, Byrne BA, Leon M, Perez-Gutierrez E, Ovalle MV, et al. Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia. Journal of food protection. 2012;75(5):874-83. Epub 2012/05/09.
143. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, et al. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(9):2864-7.
144. Truppia LA, Mollerach A, Di Conza JA, Radice M, Mugna V, Méndez E, et al. Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe ( Argentina ). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23(9):525-8.
145. Power P, Di Conza J, Rodriguez MM, Ghiglione B, Ayala JA, Casellas JM, et al. Biochemical characterization of PER-2 and genetic environment of *bla*<sub>PER-2</sub>. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(7):2359-65. Epub 2007/04/18.
146. Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, et al. Changing epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(11):6003-5. Epub 2012/08/22.
147. Rapoport M, Monzani V, Pasteran F, Morvay L, Faccone D, Petroni A, et al. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase finally emerging in Argentina. Int J Antimicrob Agents. 2008;31(4):385-7.
148. Arlet G, Barrett TJ, Butaye P, Cloeckert A, Mulvey MR, White DG. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. Microb Infect. 2006;8: 1945-54.
149. Carattoli A, Tosini F, Giles WP, Rupp ME, Hinrichs SH, Angulo FJ, et al. Characterization of Plasmids Carrying CMY-2 from Expanded-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Strains Isolated in the United States between 1996 and 1998. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(5):1269-72.
150. Rothrock MJ, Jr., Ingram KD, Gamble J, Guard J, Cicconi-Hogan KM, Hinton A, Jr., et al. The characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated from the scalding tank water of a commercial poultry processing plant: Recovery of a multidrug-resistant Heidelberg strain. Poult Sci. 2015;94(3):467-72. Epub 2015/02/15.

151. Gray JT, Hungerford LL, Fedorka-Cray PJ, Headrick ML. Extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* isolates of animal origin. J Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(8):3179-81. Epub 2004/07/27.
152. Yong D, Lim YS, Yum JH, Lee H, Lee K, Kim EC, et al. Nosocomial outbreak of pediatric gastroenteritis caused by CTX-M-14-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serovar London. J of Clin Microbiol. 2005;43(7):3519-21. Epub 2005/07/08.
153. Bado I, Garcia-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Betancor L, Caiata L, Seija V, et al. First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring *bla*<sub>CTX-M-14</sub> in South America. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(4):2132-4. Epub 2012/02/01.
154. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(6):2227-38. Epub 2009/03/25.
155. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin Microbiol Infect. 2011;17(6): 873-80.
156. Dominguez JE, Gutkind GO, Di Conza JA, Mercado EC. Occurrence of plasmidic AmpC  $\beta$ -lactamase in a *Salmonella Typhimurium* isolate of equine origin: First report of CMY-2 in animals in Argentina. J Glob Antimicrob Resist. 2015;3(4):315-6.
157. Cordeiro NF, Yim L, Betancor L, Cejas D, García-Fulgueiras V, Mota MI, et al. Identification of the first *bla*CMY-2 gene in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolates obtained from cases of paediatric diarrhoea illness detected in South America. J Glob Antimicrob Res. 2013;1(3):143-8.
158. Cejas D, Vignoli R, Quinteros M, Marino R, Callejo R, Betancor L, et al. First detection of CMY-2 plasmid mediated  $\beta$ -lactamase in *Salmonella* Heidelberg in South America. Rev Argent Microbiol. 2014;46(1):30-3.
159. Tagg KA, Iredell JR, Partridge SR. Complete sequencing of IncI1 sequence type 2 plasmid pJIE512b indicates mobilization of *bla*<sub>CMY-2</sub> from an IncA/C plasmid. Antimicrob Agents chemother. 2014;58(8):4949-52. Epub 2014/06/04.
160. Yassine H, Bientz L, Cros J, Goret J, Bébéar C, Quentin C, et al. Experimental evidence for IS1294b-mediated transposition of the *bla*<sub>CMY-2</sub> cephalosporinase gene in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2015;70(3):697-700.
161. Fitch FM, Carmo-Rodrigues MS, Oliveira VG, Gaspari MV, Dos Santos A, de Freitas JB, et al.  $\beta$ -Lactam Resistance Genes: Characterization, Epidemiology, and First Detection of *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *bla*<sub>CTX-M-14</sub> in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry in Brazil-Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. Microb Drug Resist. 2016;22(2):164-71. Epub 2015/09/19.
162. Di Cesare A, Losasso C, Barco L, Eckert EM, Conficoni D, Sarasini G, et al. Diverse distribution of Toxin-Antitoxin II systems in *Salmonella enterica* serovars. Sci Rep. 2016;6:28759. Epub 2016/07/01.
163. Lobato-Marquez D, Molina-Garcia L, Moreno-Cordoba I, Garcia-Del Portillo F, Diaz-Orejas R. Stabilization of the Virulence Plasmid pSLT of *Salmonella* Typhimurium by Three Maintenance Systems and Its Evaluation by Using a New Stability Test. Front Mol Biosci. 2016;3:66. Epub 2016/11/02.
164. Fernandes SA, Paterson DL, Ghilardi-Rodrigues AC, Adams-Haduch JM, Tavechio AT, Doi Y. CTX-M-2-Producing *Salmonella* Typhimurium Isolated from Pediatric Patients and Poultry in Brazil. Microb Drug Resist. 2009;15(4):317-21.

165. Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol*. 2000;88:729-45.
166. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):123-40. Epub 2004/03/26.
167. Galli L, Brusa V, Singh P, Cataldi AA, Manning S, Peral-Garcia P, et al. High prevalence of clade 8 *Escherichia coli* O157:H7 isolated from retail meat and butcher shop environment. *Infection, genetics and evolution : J Mol Epidemiol Evolution Genet Infect Dis*. 2016;45:1-5. Epub 2016/10/23.
168. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, Gonzalez EA, et al. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (eae- ). *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):645-51.
169. Rabinovitz BC, Vilte DA, Larzabal M, Abdala A, Galarza R, Zotta E, et al. Physiopathological effects of *Escherichia coli* O157:H7 inoculation in weaned calves fed with colostrum containing antibodies to EspB and Intimin. *Vaccine*. 2014;32(30):3823-9. Epub 2014/05/07.
170. Mercado EC, Gioffré A, Rodríguez SM, Cataldi A, Irino K, Elizondo AM, et al. Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Isolated from Diarrhoeic Calves in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004;51(2):82-8.
171. Mercado EC, Gioffre A, Rodríguez SM, Cataldi A, Irino K, Elizondo AM, et al. Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Isolated from Diarrhoeic Calves in Argentina. *J Vet Med* 2004;51:82-8.
172. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase type. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(1):54-61.
173. Miccio L, Rumi MV, Llorente P, Bentancor AB. Contaminación de carne molida con cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénico (STEC) provenientes de comercios minoristas de San Martín, Buenos Aires, categorizados según nivel socioeconómico. *In Vet*. 2011;13(1):37-44.
174. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffre A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol*. 2004;96(2):189-98. Epub 2004/09/15.
175. Harada K, Asai T. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:180682. Epub 2010/07/01.
176. Asai T, Kojima A, Harada K, Ishihara K, Takahashi T, Tamura Y. Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. *Jap J of Infect Dis*. 2005;58(6):369- 72.
177. Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goni P, Giraldo E, et al. Association between Double Mutation in *gyrA* Gene of Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(10):2477-9.
178. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;25(5):358-73. Epub 2005/04/26.

179. Albornoz E, Lucero C, Romero G, Quiroga MP, Rapoport M, Guerriero L, et al. Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria from Argentina. *Microb Drug Resist*. 2016.
180. Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:1001–5.
181. Tong P, Sun Y, Ji X, Du X, Guo X, Liu J, et al. Characterization of antimicrobial resistance and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from chickens. *Food Pathog Dis*. 2015;12(4):345-52. Epub 2015/03/19.
182. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81. Epub 2011/07/29.
183. Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri Junior A, Darini AL. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from poultry in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(4):444-8. Epub 2016/06/18.
184. Yuan L, Liu JH, Hu GZ, Pan YS, Liu ZM, Mo J, et al. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 11):1449-53. Epub 2009/07/04.
185. Li S, Zhao M, Liu J, Zhou Y, Miao Z. Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Shandong Province, China. *J Food Protect*. 2016;79(7):1169-73. Epub 2016/07/01.
186. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, et al. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(3):295-316. Epub 2009/12/25.
187. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci*. 2005;84(4):634-43.
188. Sarkar P, Gould IM. Antimicrobial agents are societal drugs: how should this influence prescribing? *Drugs*. 2006;66(7):893-901.
189. Giguère S., Prescott J., P. D. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Fifth Edition. 2006.
190. Pitout JDD. Multiresistant *Enterobacteriaceae*: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6(5):657-69.
191. Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, Kumeda Y, Suzuki Y. Characterization of Third-Generation-Cephalosporin-Resistant Shiga Toxin-Producing Strains of *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *J of Clin Microbiol*. 2015;53(9):3035-8. Epub 2015/07/03.
192. Allen KJ, Laing CR, Cancarevic A, Zhang Y, Mesak LR, Xu H, et al. Characteristics of clinical Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from British Columbia. *BioMed res Int*. 2013;2013:878956. Epub 2013/11/08.
193. Mataseje LF, Baudry PJ, Zhanel GG, Morck DW, Read RR, Louie M, et al. Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67(4):387-91. Epub 2010/07/20.

194. Egervarn M, Borjesson S, Byfors S, Finn M, Kaipe C, Englund S, et al. *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or transferable AmpC  $\beta$ -lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *Int J Food Microbiol*. 2014;171:8-14. Epub 2013/12/04.
195. Bergeholtz RD, Jorgensen MS, Hansen LH, Jensen LB, Hasman H. Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(1):207-9. Epub 2009/05/21.
196. Botelho LA, Kraychete GB, Costa e Silva JL, Regis DV, Picão RC, Moreira BM, et al. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(2):249-54.
197. Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri A, Jr., Darini AL. Detection of chromosomal bla(CTX-M-2) in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):O623-6. Epub 2014/01/21.
198. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):165-74. Epub 2006/12/13.
199. Kameyama M, Chuma T, Yabata J, Tominaga K, Iwata H, Okamoto K. Prevalence and Epidemiological Relationship of CMY-2 AmpC B-Lactamase and CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Broiler Farms in Japan. *J Vet Med Sci*. 2013;75(8):1009-15.
200. Del Rio-Avila C, Rosario C, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Diaz-Aparicio E, Suarez-Guemes F, et al. Characterisation of quinolone-resistant *Escherichia coli* of 1997 and 2005 isolates from poultry in Mexico. *Br Poult Sci*. 2016;57(4):494-500. Epub 2016/05/12.
201. Oh JY, Kwon YK, Tamang MD, Jang HK, Jeong OM, Lee HS, et al. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Wild Birds and Chickens in South Korea. *Microb Drug Resist*. 2016;22(1):69-79. Epub 2015/07/25.
202. Yousfi M, Mairi A, Touati A, Hassissene L, Brasme L, Guillard T, et al. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria. *J Infect Chemother*. 2016;22(7):431-5. Epub 2016/05/02.
203. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill*. 2016;21:17.
204. Yang YQ, Zhang AY, Ma SZ, Kong LH, Li YX, Liu JX, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and ESBL on a single plasmid in *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(8):2336-8. Epub 2016/06/23.
205. Zhi C, Lv L, Yu LF, Doi Y, Liu JH. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):292-3.
206. Nordmann P, Lienhard R, Kieffer N, Clerc O, Poirel L. Plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* in bacteremia in Switzerland. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016;15:1322-3.
207. Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day M, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of

*Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. J Antimicrob Chemother. 2016;71(8):2300-5. Epub 2016/04/20.

208. Li A, Yang Y, Miao M, Chavda KD, Mediavilla JR, Xie X, et al. Complete Sequences of *mcr-1*-Harboring Plasmids from Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. Antimicrob agents and chemother. 2016;60(7):4351-4. Epub 2016/04/20.

209. Miranda G, Kelly C, Solorzano F, Leanos B, Coria R, Patterson JE. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing To Study an Outbreak of Infection Due to *Serratia marcescens* in a Neonatal Intensive Care Unit. Journal of clinical microbiology. 1996 34(12):3138-41.