Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas de porcinos con infecciones entéricas provenientes de granjas de producción tecnificada

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Michelle Shirley MONTERROSO CAMARENA

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA DE CAMACHO

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Monterroso M. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas de porcinos con infecciones entéricas provenientes de granjas de producción tecnificada [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2017.

11-R. 61-

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día Martes **19 de diciembre de 2017**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0259-EPMV/FMV-2017**, integrado por los siguientes profesores:

MV Antonio Ampuero Bustillo	Presidente del Jurado
Blga. Mg. Sonia Calle Espinoza	Asesora de la Tesis
MV Mg. Siever Morales Cauti	Miembro del Jurado
MV Mg. Mercy Ramírez Velásquez	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **MONTERROSO CAMARENA, MICHELLE SHIRLEY** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* AISLADAS DE PORCINOS CON INFECCIONES ENTÉRICAS PROVENIENTES DE GRANJAS DE PRODUCCIÓN TECNIFICADA",

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las 11:00 **horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Antonio Ampuero Bustillo: Prof. Asociado, D.E.

Sonia Calle Espinoza: Mg. Prof. Principal D.E.

Siever Morales Cauti, Mg. Prof. Asociado T.P.

Mercy Ramírez Velásquez: Mg. Prof. Auxiliar D.E.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral Nº 0259-EPMV/FMV-2017

PRESIDENTE : .....
ANTONIO AMPUERO BUSTILLO

MIEMBROS : .....
SONIA CALLE ESPINOZA
Asesora de la Tesis

: .....
SIEVER MORALES CAUTI

: .....
MERCY RAMIREZ VELÁSQUEZ

San Borja, 19 de diciembre de 2017

Vº Bº

.....
MV Mg. Hermelinda Rivera Gerónimo
Directora (e)
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS - Escuela Profesional - FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

Dedicado a los que creen en sí mismos, a los que se encuentran en el proceso de mejora,
aquellos que con el poder de la mente y el corazón luchan por hacer sus sueños realidad.

Agradezco a la vida, a la naturaleza a Dios.

A mi querida mami Edith que con su ejemplo de superación y amor me dio las herramientas necesarias para lograr mis metas y ser feliz.

A mis abuelitos por sus enseñanzas y valores que me hicieron desde pequeña una persona muy cercana a la naturaleza, los animales y la vida.

A mis tíos por enseñarme que si no lo haces tú nadie más lo hará por ti, en especial a Sesy, muchas gracias.

A mi padre por enseñarme que nunca hay que darse por vencido, a luchar por los sueños.

Gracias amigos por sus constantes ánimos, apoyo y alegrías brindados en el proceso de aprendizaje y crecimiento personal, los tendré siempre presentes.

Equipo del Laboratorio de Bacteriología, sin su ayuda no lo hubiera logrado, son de lo mejor, excelentes personas ¡Gracias por todo su apoyo!

A todos aquellos que con sus palabras y acciones hicieron posible la realización de esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN xiii

ABSTRACT ix

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS x

I-INTRODUCCIÓN 1

II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3

2.1.- Género *Escherichia* 3

2.1.1 Antecedentes 3

2.1.2 Características generales 3

2.1.3 Factores que afectan el crecimiento y supervivencia 5

2.1.4 Estructura antigénica 5

2.1.5 Clasificación 6

2.1.6 Epidemiologia 6

2.2.- Resistencia Antimicrobiana 7

2.2.1 Resistencia antibiótica: un problema en la salud pública 7

2.2.2 Causas Potenciales 8

2.3.- Mecanismo de acción de los antibióticos 10

2.3.1 Síntesis de pared bacteriana 10

2.3.2 Síntesis de proteínas 11

2.3.3 Replicación del ADN 13

2.3.4 Metabolismo bacteriano 13

2.4 Mecanismos de resistencia a los antibióticos 14

2.4.1 Modificaciones de la molécula antibiótica 14

2.4.2 Alteraciones químicas 14

2.4.3 Destrucción de la molécula antibiótica 16

2.4.3.1 Betalactamasas AmpC 18

2. 4.4. Ingreso del antibiótico: Disminución de la permeabilidad 21

2. 4.5 Bombas de eflujo 23

2.4.6 Cambios en la molécula diana 24

2.4.7 Protección 24

2.4.8 Modificación 25

2.4.8.1 Mutaciones del sitio blanco 25

2.4.8.2 Alteración enzimática del sitio blanco 25

2.4.8.3 Reemplazo completo del sitio blanco 27

III-MATERIALES Y MÉTODOS 29

3.1 Diseño del estudio 29

3.2 Lugar de ejecución y periodo de duración 29

3.3 Descripción y tamaño de muestra 29

3.4 Materiales usados en el laboratorio 30

3.5 Identificación de las muestras 30

3.6 Procesamiento de las muestras 30

3.6.1 Reactivación de los aislados 30

3.6.2 Pruebas Bioquímicas 31

3.6.3 Estudios de Sensibilidad 31

IV-RESULTADOS 38

V-DISCUSIÓN 43

VI-CONCLUSIONES 47

VII-LITERATURA CITADA 48

RESUMEN

Escherichia coli es una enterobacteria de importancia en salud pública, que destaca por su ubicuidad y resistencia a antimicrobianos, afecta tanto al hombre como a los animales, resultando en infecciones que no responden a tratamientos con drogas convencionales. El objetivo del estudio fue la detección fenotípica de mecanismos de resistencia a betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos de aislados de *Escherichia coli* mediante el uso de la técnica de Kirby Bauer siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Se utilizaron 36 aislados de *Escherichia coli* provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología sección de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se trabajó con un total de 15 antibióticos de importancia humana y veterinaria. Se encontraron altas frecuencias de resistencia antimicrobiana al ácido nalidíxico 89%(32/36), cloxacilina 83% (30/36) y amoxicilina-ácido clavulánico 69%(25/36). Del total de aislados, un 3% (1/36) presentó AmpC inducible. De los mecanismos de resistencia a quinolonas un 42% (15/36) evidenció una posible mutación en gyrA, el 14% (5/36) al menos dos posibles mutaciones en gyrA o gyrA+parC, además el 33% (12/36) presentó altas probabilidades de genes qnr. Finalmente, las enzimas del mecanismo de resistencia a aminoglucósidos evidenciadas fueron un 39% (14/36) de AAC (6'), 28% (10/36) ANT (2"), 11% (4/36) AAC (3) IV. El conocimiento de los mecanismos de resistencia antimicrobiana son de suma importancia para entender el constante desarrollo de resistencia antimicrobiana en nuestro medio, de manera que el Médico Veterinario pueda tomar conciencia de esta problemática, que afecta tanto a la población humana como animal y le permita intervenir mediante el uso racional de los antibióticos.

Palabras clave: *Escherichia coli*, porcino, mecanismos, resistencia antimicrobiana, antibióticos, salud pública.

ABSTRACT

Escherichia coli is an enterobacteria of importance in public health, which stands out for its ubiquity and resistance to antimicrobials, affects both man and animals, resulting in infections that do not respond to conventional drug treatments. The objective of the study was the phenotypic detection of resistance mechanisms to beta-lactams, quinolones and aminoglycosides of *Escherichia coli* isolates by using the Kirby Bauer technique following the recommendations of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Thirty-six *Escherichia coli* isolates from the cepario of the Laboratory of Microbiology and Parasitology section of Bacteriology and Mycology of the Faculty of Veterinary Medicine of the National University of San Marcos were used. We worked with a total of 15 antibiotics of human and veterinary importance. High frequencies of antimicrobial resistance were found to nalidixic acid 89% (32/36), cloxacillin 83% (30/36) and amoxicillin-clavulanic acid 69% (25/36). Of the total of isolates, 3% (1/36) presented inducible AmpC. Of the quinolone resistance mechanisms, 42% (15/36) showed a possible mutation in gyrA, 14% (5/36) at least two possible mutations in gyrA or gyrA + parC, in addition 33% (12/36)) presented high probabilities of qnr genes. Finally, the enzymes of the mechanism of resistance to aminoglycosides evidenced were 39% (14/36) of AAC (6 '), 28% (10/36) ANT (2 "), 11% (4/36) AAC (3) IV. The knowledge of the mechanisms of antimicrobial resistance is of great importance to understand the constant development of antimicrobial resistance in our environment, so that the veterinarian can be aware of this problem, which affects both the human and animal population, and allows him intervene through the rational use of antibiotics.

Key words: *Escherichia coli*, pigs, mechanisms, antimicrobial resistance, antibiotics, public health.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli***.** Pág 5**.**

Cuadro 2: Identificación de los aislados de *Escherichia coli.* Pág 30.

Cuadro 3: Antibióticos utilizados según puntos de corte considerados por CLSI. Pág 32.

Cuadro 4: Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a Aminoglucósidos. Pág 37.

Cuadro 5: Frecuencia absoluta y relativa de la susceptibilidad de *Escherichia coli* a los antibióticos. Pág 39.

Figura 1: *Escherichia coli* visualizado con microscopía electrónica**.** Pág 4**.**

Figura 2: Antibióticos y molécula diana. Mecanismos de muerte celular producidos. Pág 12.

Figura 3: Enzimas que modifican aminoglucósidos y sus sustratos. Pág 15.

Figura 4: Representación esquemática de las β-lactamasas. Pág 17.

Figura 5: Sistema de expresión y represión del gen *ampC*. Pág 20.

Figura 6: Mecanismos de resistencia a antibióticos: modificación por porinas. Pág 22.

Figura 7: Principales tipos de sistemas de eflujo bacterianos. Pág 24.

Figura 8: Control post-transcripcional del gen *erm*C. Pág 26.

Figura 9: Representación esquemática de la síntesis de peptidoglucano y mecanismos de acción (A) y resistencia (B) de la vancomicina**.** Pág 28.

Figura 10: Porcentajes de aislados de *Escherichia coli* sensibles, intermedios y resistentes frente a los antibióticos probados. Pág 40.

Figura 11: Método de detección de AmpC de tipo inducible usando el método de aproximación de discos. Pág 40.

Figura 12: Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana para quinolonas en aislados de *Escherichia coli*. Pág 41.

Figura 13: Porcentajes de tipo de mecanismo de resistencia a quinolonas, posibles mutaciones genéticas en gyr A, gyrA+parC o presencia del gen qnr. Pág 42.

Figura 14: Distribución porcentual de mecanismos de resistencia antimicrobiana a aminoglucósidos en aislados de *Escherichia coli*. Pág 42.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la utilización de agentes antimicrobianos se ha visto notablemente incrementada, no solo en medicina humana sino también medicina veterinaria. Como consecuencia de ello, la aparición de cepas resistentes se ha convertido en un problema de índole mundial. En medicina veterinaria, los antimicrobianos se emplean en animales de compañía y de producción; en estos últimos; con fines terapéuticos, profilácticos o como promotores del crecimiento adicionados en el alimento. Las empresas de nutrición, incluyen a los antimicrobianos como aditivos en los alimentos que se utilizan en las diferentes etapas productivas, que son los mismos productos o principios activos que se utilizan para el tratamiento de infecciones en humanos (Prescott, 2000; Harada *et al*., 2007; Stine *et al*., 2007). Dada la importancia del problema, en muchos países del mundo ya se han puesto en marcha programas de vigilancia y monitoreo de la resistencia antimicrobiana. Estos están principalmente orientados al estudio de patógenos humanos, microorganismos zoonóticos y bacterias indicadoras de la flora intestinal normal de los animales (OIE, 2016).

Las bacterias resistentes presentes en los animales de producción pueden transmitirse al hombre indirectamente vía la cadena alimenticia, o directamente del animal, y resultan en infecciones que no responden a tratamientos con drogas convencionales (Helmuth y Hensel, 2004). El alimento de origen animal sirve entonces como un vehículo de transporte para bacterias resistentes y genes de resistencia antimicrobianos al humano (Van den Bogaard *et al.,* 2000). Adicionalmente al problema relacionado a la salud humana, los patógenos resistentes a antimicrobianos también suponen un problema de salud animal severo y costoso, al prolongar la enfermedad y bajar la productividad por sus altos índices de morbilidad y mortalidad (Bischoff *et al*., 2002). Existen tres métodos de supervisión de resistencia: *in vivo, in*

vitro y moleculares. Los métodos *in vitro* son los preferidos para la vigilancia de la resistencia de la gran mayoría de las bacterias patógenas (OMS, 2001).

Una variedad de métodos pueden ser utilizados para medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos a antimicrobianos, el de uso más común en los laboratorios de microbiología es la difusión en agar (Kirby Bauer) para microorganismos de crecimiento rápido (Cona, 2002). Estas técnicas *in vitro* permiten describir los mecanismos de resistencia mediante la expresión fenotípica de las bacterias a diferentes grupos de antimicrobianos, tales como: betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos. La técnica de Kirby Bauer permite detectar β-lactamasas de espectro extendido, las resistentes a los inhibidores, las de tipo AmpC y las carbapenemasas; las resistencias a quinolonas por mutaciones en los genes de la DNA girasa y la topoisomerasa IV o las mediadas por plásmidos; y los patrones de resistencia a aminoglucósidos debidos a la expresión de enzimas modificadoras (Martínez y Calvo, 2010).

Por esas razones, la OMS y la organización Mundial de la Salud Animal (OIE) recomiendan el monitoreo de microorganismos resistentes a múltiples antimicrobianos entre los que destaca *Escherichia coli*. La prevalencia de este patógeno resistente es un buen indicador de la presión selectiva por el uso indebido de antimicrobianos y de problemas de resistencia ligado a bacterias patógenas (Van den Bogaard *et al.,* 2000). Las cepas de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos pueden constituir un reservorio de genes transferibles a otras poblaciones bacterianas potencialmente patógenas (Lim *et al.*, 2007). Por ejemplo, plásmidos que confieren resistencia a múltiples antimicrobianos pueden transferirse desde *Escherichia coli* a bacterias como *Salmonella Typhimurium* u otros patógenos de importancia no sólo en medicina veterinaria, también en la salud pública (Kikuvi *et al*., 2007). En nuestro país, aún no se ha desarrollado ningún programa con estas características para la detección fenotípica de mecanismos de resistencia *in vitro* para aislamientos de *Escherichia coli* de origen animal.

El objetivo del estudio fue la detección fenotípica de mecanismos de resistencia a betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos de aislados de *Escherichia coli* mediante la técnica de Kirby Bauer siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 GENERO *Escherichia*

2.1.1. ANTECEDENTES

En el año de 1885 el pediatra Theodor Escherich presenta a la Sociedad de Morfología y Fisiología la conferencia "Las bacterias intestinales del recién nacido y del infante" en la cual describe la morfología y las propiedades de una población bacteriana a la que denominó "bacteria común del colon" observadas en heces de lactantes alimentados solo con leche materna a las 27 horas de nacido y 6 meses de edad. (Escherich, 1885). Estudios posteriores demostraron que *Escherichia coli* coloniza a los neonatos pocas horas después del nacimiento, evento que ocurre durante el parto, ya que estas cepas iniciales suelen ser serológicamente idénticas a las encontradas en la madre (Bettelheim *et al*., 1974).

2.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Escherichia coli pertenece al orden Enterobacteriales, de la familia Enterobacteriaceae, género *Escherichia* (Garrity *et al*., 2004). En base a la secuenciación de su rRNA 16S, *Escherichia coli* pertenece a la clase Gammaproteobacteria (Castellani y Chalmers, 1919). Las Enterobacteriaceae son conocidas como bacterias entéricas que habitan en el tracto gastrointestinal, el cual está formado por estructuras del sistema digestivo que abarca desde la cavidad oral, esófago, estómago, intestinos, recto hasta el ano (Manning D, 2010).

Son anaerobios facultativos, cocobacilos Gram negativos de 1,5 µm de diámetro por 2,0-6,0 µm de longitud, agrupados en parejas o solos. Presentan motilidad por flagelos perítricos y algunos no son móviles. Pueden ser aerobio o anaeróbio facultativo presentando un metabolismo tanto respiratorio como fermentativo (Garrity *et al.,* 2005).

Figura 1. *Escherichia coli* visualizado con microscopía electrónica (Phillip D, 2010.)



Las pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* son oxidasa negativa productores de ácidos fuertes así como de gas durante la fermentación de d- glucosa , es negativo a la prueba de Voges Proskauer y Citrato de Simmons, descarboxila lisina, fermentadores de lactosa, no producen H2S, indol positivo, descarboxilan lisina. *Escherichia coli* se produce de forma natural en la parte inferior del intestino de los animales de sangre caliente (Castellani y Chalmers, 1919 ; Garrity, *et al*., 2005, Manning D, 2010;).

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli* (Farmer JJ., 1995)

Prueba bioquímica	*% de positividad*
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H_2S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Acido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0
KCN crecimiento en	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de a -metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nitrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de Acetato	90
Lipasa (aceite de maíz)	0
DNasa a 25 °C	0
ONPG	95

2.1.3. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

Las cepas de *E. coli* sobreviven y crecen a medio plazo (15-45ºC). La mayoría de las cepas pueden alcanzar un rango de temperatura de aproximadamente 40 ° C. El rango de temperatura normal para el crecimiento equilibrado se extiende de 21 a 37°C sin embargo se han descrito cepas que pueden crecer a temperaturas tan bajas como 7.5-7.8°C (Shaw *et al*., 1971) y tan altas como 49°C (Herendeen *et al*., 1979). *Escherichia coli* es neutrofílica y crecerá sobre el rango medio de pH, desde aproximadamente pH 5,0 a 9,0 (Ingraham y Marr, 1996 ; Garrity *et al*., 2005).

2.1.4. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Escherichia coli es serotipificado sobre la base de sus perfiles de antígeno de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular)(Stenutz *et al*., 2006).

El antígeno O basa su antigenicidad en el LPS, que va desde el O1 hasta O173, además se incluyen los grupos O provisionales OX3 y OX7 enumerados por Ewing

en 1986, los cuales reciben las designaciones O174 y O175, respectivamente (Garrity *et al*., 2005).

Los antígenos K son los antígenos de polisacáridos capsulares ácidos (CPS). Los cuales se dividen en grupo I y grupo II. Los antígenos del Grupo I, están compuestos de CPS de alta masa molecular (100 kDa) (Dodgson *et al*., 1996). Los antígenos del grupo II de CPS presentan semejanzas estructurales a las bacterias Gram positivas (Pearce y Roberts 1995).

El tercer grupo de antígenos lo constituye el antígeno flagelar o H, del cual se conocen 55. La combinación específica de antígenos O y H define el "serotipo" de un aislado (Nataro y Kaper, 1998). La infección ocasionada por un serotipo proporciona las pistas del tipo de *Escherichia coli*, del cual de manera particular pueden ser los causantes de brotes (Manning , 2010).

2.1.5. CLASIFICACIÓN

Entre las *E. coli* que causan enfermedades intestinales, se dividen en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), enteroagregativa. *E. coli* (EAEC) y *E. coli* adherentes de forma difusa (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998).

2.1.6. EPIDEMIOLOGÍA

La colibacilosis en cerdos puede manifestarse en síndromes como: Diarrea Neonatal, Diarrea post destete y Enfermedad edematosa (López-Álvarez, 2010). *Escherichia coli* responsable del síndrome diarreico se agrupa en 2 patotipos de acuerdo a sus factores de patogenicidad en ETEC y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC). ETEC es el patotipo más importante que incluye cepas que elaboran una o varias enterotoxinas que inducen Diarrea secretoria en lechones (Zimmerman *et al*., 2012). Bessonel *et al*., (2015) encontró que 82.14% de los casos de Diarrea en lechones en Argentina eran producidos por ETEC mientras que un 17.86% eran producidos por STEC.

La colibacilosis neonatal debida a ETEC en lechones lactantes se produce dentro de la primera semana de vida. Por lo general está asociada a camadas de cerdas primerizas que se infectan rápidamente tras el nacimiento ubicado en ambientes con pobre higiene y alta contaminación fecal (López-Álvarez, 2010).

El suministro de calostro constituye un factor de riesgo debido a que al poseer factores antimicrobianos inespecíficos y anticuerpos maternales que inhiben la adherencia de la bacteria, su ausencia o niveles insuficientes provocarían que los lechones queden susceptibles a la infección. La temperatura para el lechón en la maternidad influye en el proceso de infección, ya que por debajo de 25 °C la actividad peristáltica del lechón recién nacido disminuye y el pasaje de calostro y bacterias se retrasa (Novartis, 2007).

La colibacilosis post destete es una enfermedad de distribución mundial que afecta a granjas de cerdos en confinamiento. La falla en la coordinación y mal manejo de procesos propios del destete como el cambio nutricional, social, medio ambiental y fisiológico ocasionan un ambiente propicio para el desarrollo de la enfermedad (Moredo *et al*., 2007).

El tratamiento del cuadro entérico se basa en la aplicación de antibióticos de amplio espectro, aunque las cepas de *Escherichia coli* varían mucho en sensibilidad a los antibióticos y la resistencia antimicrobiana ha ido aumentando en los últimos años (Novartis, 2007).

2.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

2.2.1 RESISTENCIA ANTIBIÓTICA: UN PROBLEMA EN LA SALUD PÚBLICA

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta el campo de la salud humana y animal (Ciorba *et al.*, 2015). A pesar de ser un proceso evolutivo natural, la crisis de la resistencia antibiótica se ha atribuido al uso excesivo y mal uso de estos medicamentos, así como la falta de desarrollo de nuevas drogas por la industria farmacéutica debido al

reducido incentivo económico y requerimientos regulatorios engorrosos en todo el mundo (Anne *et al.*, 2014; Jindal *et al.*, 2015).
La dispersión de nuevos mecanismos de resistencia amenaza el éxito del tratamiento de enfermedades infecciosas en todo el mundo, resultando en enfermedades prolongadas, mayores costos de tratamiento e inclusive la muerte (WHO, 2017).

En el 2013, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en EE. UU. afirmó que la humanidad se encuentra en una era denominada "post-antibiótica"(Moellering, 2011). En mayo de 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró como extrema la crisis de la resistencia antibiótica (WHO, 2017). El potencial impacto económico futuro generado en una gran y creciente población humana desprovista de antibióticos se volverá significativo (Smith *et al.*, 2011). Un mayor número de individuos enfermarán, imposibilitando el trabajo. Además, la creciente carga de cuidados a las personas enfermas por parte de sus familias y comunidad, así como también en los sistemas más amplios de atención médica, tendrán repercusiones económicas, sociales y culturales (Trilla *et al.*, 2008; Anne *et al.*, 2014).

2.2.2 CAUSAS POTENCIALES

Debido a su tamaño, los microorganismos son simples comparados con organismos multicelulares. Esta simplicidad se ve reflejada en el pequeño tamaño de su genoma. Sin embargo, al ser considerados como comunidad, las poblaciones microbianas tienen una gran capacidad de adaptarse al medio de manera rápida y efectiva. La llave para esta adaptabilidad está basada en la gran cantidad de microorganismos presentes en pequeños volúmenes y su rápida multiplicación, que puede ser desde 20 minutos como en *Escherichia coli*. Entonces, mientras que ligeros cambios al genoma pueden ser raros, el vasto número de microorganismos presente asegura que las variaciones en la población microbiana ocurran regularmente. De manera similar, la rápida generación de células asegura que los cambios que permitan alguna ventaja serán prevalentes rápidamente en una comunidad en constante crecimiento (Michael *et al*., 2014).

Una fuente de variabilidad genética son las mutaciones, como cambios aleatorios en las secuencias genéticas de los organismos que generalmente no tienen efectos beneficiosos o perjudiciales. Sin embargo, al involucrarse inmensas cantidades de organismos, la chance de que existan cambios raros y ventajosos es inevitable (Michael *et al*., 2014).

Una segunda fuente de variabilidad está disponible en los grandes reservorios de genes que pueden movilizarse entre y dentro de especies bacterianas. Estos genes móviles se encuentran disponibles en las comunidades microbianas a través de variados mecanismos de transferencia horizontal de genes. Muchos de estos genes portan información útil para la supervivencia de la bacteria a distintas condiciones: metales pesados, estrés oxidativo, rayos UV, factores de virulencia o resistencia antibiótica, entre otros (Michael *et al*., 2004; Gillings, 2014).

Los antibióticos tienen como función limitar o prevenir el crecimiento bacteriano, generando una presión selectiva en comunidades microbianas. Bajo un tratamiento antibiótico sólo predominarán los microorganismos capaces de sobrevivir y reproducirse, causando que esa ventaja se vuelva común (Michael *et al*., 2014). En medicina veterinaria, el uso de antibióticos se encuentra ampliamente distribuido. Se utiliza en muchos países para el tratamiento de múltiples cuadros infecciosos y como profiláctico. Inclusive, en la producción animal, los antibióticos son utilizados como parte del alimento para aumentar la ganancia de peso de los animales, uso conocido como promotores de crecimiento (McEwen y Fedorka-Cray, 2002; Butaye *et al.*, 2003).

La amenaza potencial a la salud humana resultado del uso inapropiado de antibióticos en productos derivados de animales es importante. Microorganismos resistentes y potencialmente patógenos pueden entrar a la cadena alimenticia y podría diseminarse ampliamente en productos alimenticios (Cui *et al.*, 2005; Gundogan *et al*., 2005; Garofalo *et al*., 2007;; Parveen *et al.*, 2007).

2.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Existen diversos mecanismos de acción por los cuales los antibióticos actúan como bacterioestáticos o bactericidas. En el trabajo, se agruparán a los antibióticos más importantes según la función que inhiben: síntesis de pared bacteriana, síntesis de proteínas, replicación del ADN e inhibición del metabolismo.

2.3.1 Síntesis de pared bacteriana

El peptidoglucano proporciona a la célula estabilidad rígida debido a su estructura altamente reticulada y su síntesis tiene 3 etapas. La primera y segunda tienen lugar en el citoplasma. Inicialmente, hay un enlace de amino azúcar seguido de la adición de aminoácidos específicos (L-alanina, ácido D-glutámico, L-lisina, seguido de un dipéptido, D-alanil-D-alanina) en un orden prescrito para formar difosfato de uridina (UDP) -acetilmuramil-pentapéptido. La etapa final se produce fuera de la célula para completar el enlace cruzado, cuando se agregan nuevas subunidades al peptidoglucano en crecimiento. El residuo de glicina terminal del puente de pentaglicina está relacionado con el cuarto residuo del pentapéptido (D-alanina), liberando el quinto residuo (D-alanina) (Typas *et al.*, 2011).

Los β-lactámicos (cefalosporinas, penicilinas, carbapenems) interfieren con el último paso en la síntesis de peptidoglucano al actuar como un análogo de la porción de D-alanina-D-alanina del residuo N-acetilmurámico. La conformación de penicilina es muy similar a la de D-alanina-D-alanina, por lo que las transpeptidasas (PBP: proteínas fijadoras de penicilinas) reaccionan con el núcleo del β-lactámico, inactivando la reacción de transpeptidasa y dando como resultado la formación de nuevas cadenas de peptidoglucano con poca resistencia a la tracción.

Los puntos débiles se desarrollan en la pared celular en crecimiento, lo que da como resultado la ruptura celular debido a la lisis osmótica (Höltje, 1998; Josephine *et al*., 2004) (Figura 2). Por otro lado, los glucopéptidos como la vancomicina inhiben la síntesis de peptidoglucano mediante la unión al dipéptido D-alanina-D-alanina y bloqueando la actividad transglicosilasa y transpeptidasa (Kahne *et al.,*2005).

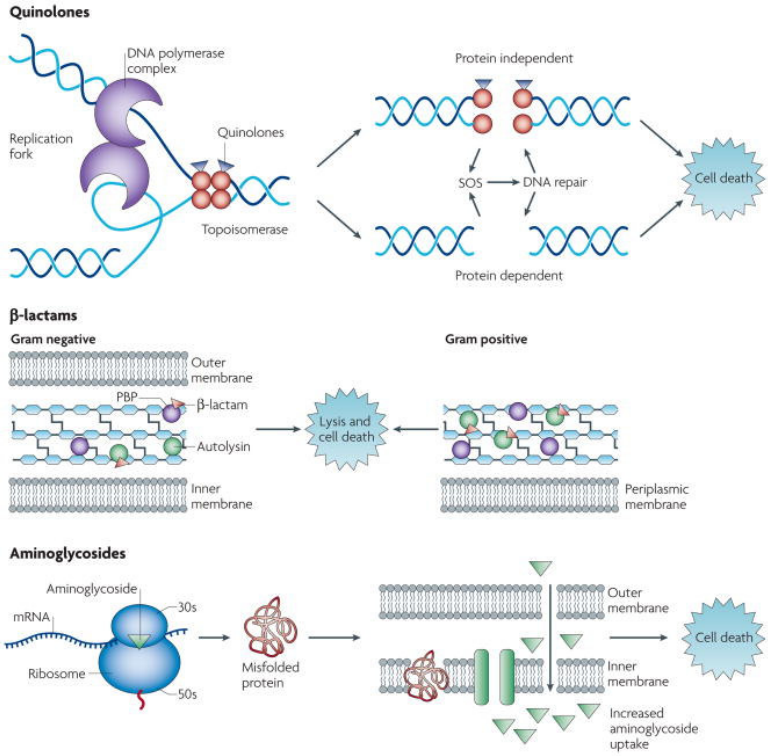
Los β-lactámicos pueden ser usados contra bacterias gram-positivas o gram-negativas, mientras que los glucopéptidos son efectivos sólo contra gram-positivas, debido a la baja permeabilidad que posee (Kohanski *et al*., 2010).

2.3.2 Síntesis de proteínas

El proceso de traducción del ARNm se produce en tres fases secuenciales (iniciación, elongación y terminación) que involucran al ribosoma y un conjunto de factores accesorios citoplasmáticos (Lodish *et al.*, 2000). La ribosoma está compuesta por dos subunidades: 50S y 30S. Los fármacos que inhiben la síntesis de proteínas se encuentran entre las clases más amplias de antibióticos y se pueden dividir en dos subclases: los inhibidores de subunidad 50S y los de subunidad 30S (Kohanski *et al.*, 2010).

Los inhibidores de ribosoma 50S incluyen las clases de antibióticos macrólidos (p. Ej., Eritromicina), lincosamidas (p. Ej., Clindamicina), estreptogramina (p. Ej., Dalfopristina / quinupristina), amfenicoles (p. Ej., Cloranfenicol) y oxazolidinona (por ejemplo, linezolid) (Katz y Ashley, 2005; Mukhtar y Wright, 2005). Estos antibióticos funcionan bloqueando físicamente la iniciación de la traducción de proteínas (como es el caso de las oxazolidinonas) (Patel *et al*., 2001) o la translocación de peptidil-ARNt, lo que sirve para inhibir la reacción de la peptidiltransferasa que elonga la cadena del péptido naciente (Menninger y Otto, 1982; Vannuffel y Cocito, 1996; Kohanski *et al.,* 2010).

Figura 2. Antibióticos y molécula diana. Mecanismos de muerte celular producidos (Kohanski *et al.*, 2010).



a) Las quinolonas interfieren en los cambios en el superenrollamiento del ADN uniéndose a la topoisomerasa II o IV. Esto conduce a la formación de roturas de ADN bicatenario y muerte celular en una forma dependiente o independiente a la síntesis de proteínas b) las β-lactámicos inhiben la transpeptidación uniéndose a PBP en hebras de peptidoglucano en maduración. La disminución de la síntesis de peptidoglucano y el aumento de las autolisinas conduce a la lisis y la muerte celular. c) Los aminoglucósidos se unen a la subunidad 30S del ribosoma y provocan la incorporación errónea de aminoácidos en los péptidos alargados. Estas proteínas mal traducidas pueden plegarse incorrectamente, y la incorporación de proteínas de membrana mal plegadas en la envoltura celular conduce a un aumento de la captación de fármaco, que junto con un aumento en la unión de ribosomas asociado con la muerte celular.

Los inhibidores de ribosomas 30S incluyen las familias de antibióticos como tetraciclinas y aminociclitoles. Las tetraciclinas funcionan bloqueando el acceso de aminoacil-ARNt al ribosoma (Chopra y Roberts, 2001). Los aminociclitoles están compuestos por espectinomicina y aminoglucósidos (por ejemplo, estreptomicina, kanamicina y gentamicina), que se unen al componente ARNr 16S de la subunidad ribosómica 30S. La espectinomicina interfiere con la estabilidad de la unión del peptidil-tRNA al ribosoma mediante la inhibición de la translocación catalizada por el factor de elongación, pero no causa una mala traducción de la proteína (Hancock, 1981; Davis, 1987). Por el contrario, la interacción entre los aminoglucósidos y el ARNr 16S puede inducir una alteración en la conformación del complejo formado

entre un codón de ARNm y su aminoacil-ARNt cargado análogo en el ribosoma, promoviendo el desacoplamiento de ARNt que puede dar lugar a una mala traducción de proteínas (Pape *et al.*, 2000).

2.3.3 Replicación del ADN

La ADN girasa es una de las topoisomerasas de ADN que actúa durante la replicación del ADN para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento. La ADN girasa produce cortes de doble cadena y después son unidos por las ligasa (Lodish *et al*., 2000; Espeli y Marians, 2004). Las quinolonas son un grupo de antibióticos cuyo objetivo es interferir en la síntesis del ADN, interactuando con dos enzimas: ADN girasa (genes *gyr*A y *gyr*B) y topoisomerasa IV (genes *par*C y *par*E) (Nitiss, 2009; Maruri *et al.*, 2012). Generalmente, el blanco en bacterias gram-negativas es el ADN girasa y la topoisomerasa IV en gram-positivas (Belland *et al*., 1994; Blondeau, 2004).

Las quinolonas son derivados del ácido nalidíxico, que se descubrió como un subproducto de la síntesis de cloroquina (quinina) y fue introducido en la década de 1960 para tratar las infecciones del tracto urinario. Son agentes antimicrobianos sintéticos con excelente actividad contra *Escherichia coli* y otras bacterias Gram negativas utilizadas en medicina veterinaria y humana. (Webber y Piddock, 2001). El ácido nalidíxico y otras quinolonas de primera generación (ácido oxolínico) rara vez se utilizan hoy en día debido a su toxicidad. Las quinolonas más utilizadas son las de segunda (ciprofloxacina), tercera (levofloxacina) y la cuarta generación (gemifloxacina) (Rubinstein, 2001).

2.3.4 Metabolismo bacteriano

Un ejemplo típico de este mecanismo de resistencia es el empleado por las sulfonamidas. Su acción se basa en la selectividad a la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS) que cataliza la condensación de ácido p-aminobenzoico (PABA) y 7,8- dihidro-6-hidroximetilpterin-pirofosfato (DHPPP) para formar ácido dihidropteroico, que es el penúltimo paso en la formación de ácido dihidrofólico (Ola Sköld, 2000).

Las células de los mamíferos no dependen de la síntesis endógena de ácido fólico, y generalmente carecen de DHPS, por lo que es consumido en la dieta. Los eucariotas

superiores pueden utilizar folatos dietéticos por absorción a través de un sistema de transporte, que la mayoría de los procariotas y algunos eucariotas menores no poseen. Estos tienen que sintetizar folatos de *novo* a partir de moléculas pequeñas, incluida la formación de ácido dihidropteroico catalizado por DHPS. Esta es la base del efecto selectivo de las sulfonamidas sobre las bacterias y su amplio espectro de actividad antibacteriana (Ola Sköld, 2000; Sköld O, 2001).

2.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Las bacterias han evolucionado con el paso de los años y han adquirido diversos mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos. Mediante el uso de mecanismos intrínsecos o adquiridos, las bacterias pueden sobrevivir el efecto de los antibióticos (Giedraitienė *et al.*, 2011; Munita y Arias, 2016).

2.4.1 Modificaciones de la molécula antibiótica

Una de las estrategias más exitosas por parte de las bacterias es la producción de enzimas que destruyan a los antibióticos, impidiendo su acción (Blair *et al.*, 2015; Munita y Arias, 2016).

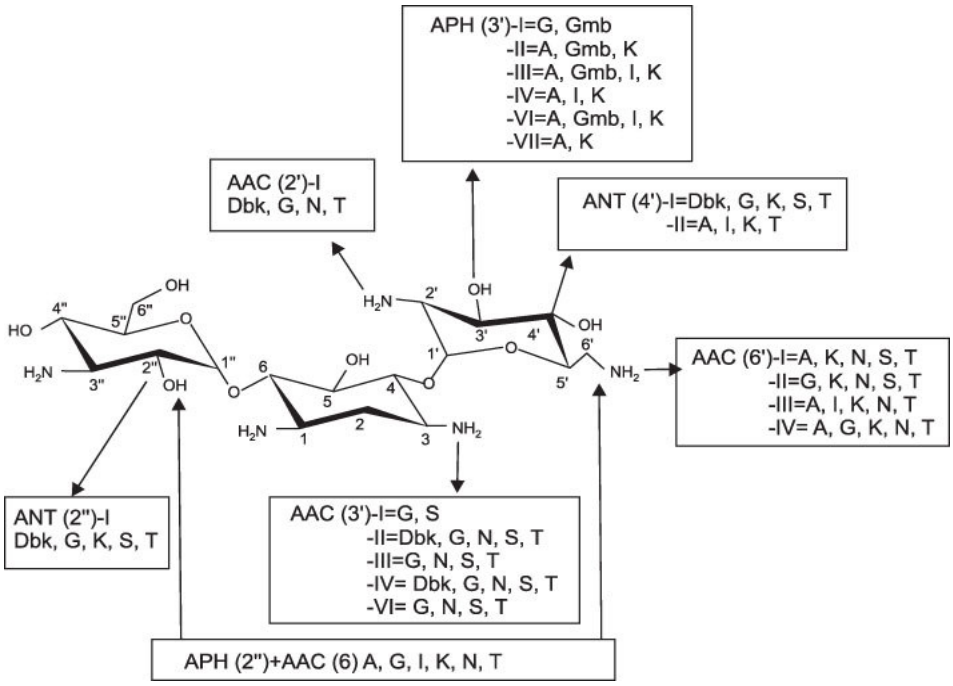
2.4.2 Alteraciones químicas

La producción de enzimas capaces de generar cambios químicos en la molécula antibiótica es un mecanismo ampliamente estudiado en bacterias gram-negativas y gram-positivas. La mayoría de los antibióticos afectados por este mecanismo son aquellos que ejercen su acción inhibiendo la síntesis de proteínas de la bacteria a un nivel ribosomal (Wilson, 2014). Se han descrito muchos tipos de enzimas capaces de desarrollar múltiples reacciones bioquímicas: acetilación (aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas), fosforilación (aminoglucósidos, cloranfenicol) y adenilación (aminoglucósidos, lincosamidas). Cualquiera de estos mecanismos genera una disminución de la avidez del antibiótico por su diana (Munita y Arias, 2016). Un ejemplo de este mecanismo de resistencia son las enzimas que actúan sobre los aminoglucósidos, que son ampliamente utilizados en todo el mundo, y son un componente esencial en el tratamiento de infecciones (Kotra *et al.*, 2000). Su eficacia se ve disminuida notablemente por el surgimiento las enzimas modificadoras

de aminoglucósidos (AME) presentes en prácticamente en casi todos los géneros bacterianos (Ramirez y Tolmasky, 2010). La nomenclatura de clasificación consideran su actividad bioquímica (Figura 3): ACC (Acetiltransferasas), ANT (Adeniltransferasas) y APH (Fosfotransferasas) (Munita y Arias, 2016).

La familia APH se encuentra ampliamente distribuida en gram-positivos y gram-negativos y altera la estructura de la kanamicina y estreptomicina, pero no afecta a la gentamicina o tobramicina (Diaz *et al.*, 2005). Por otro lado, la familia AAC se encuentra principalmente en gram-negativos incluyendo *Enterobacteriaceae, Pseudomonas* y *Acinetobacter,* y afecta a más aminoglucósidos, incluyendo a la amikacina y gentamicina (Ramirez y Tolmasky, 2010). Por otro lado, la familia ANT afecta a gentamicina y tobramicina y los genes que la codifican pueden estar presentes en gram-positivos y gram-negativos (Ramirez & Tolmasky, 2010). Algunas de estas enzimas han evolucionado para tener más de una actividad bioquímica, como AAC(6') APH(2'') presente en gram-positivos (Hollenbeck y Rice, 2012).

Figura 3. Enzimas que modifican aminoglucósidos y sus sustratos (Park, 2009).



A: Amikacina, Dbk: Dibekacina, G: Gentamicina, Gmb: Gentamicina B, I: Isepamicina, K: Kanamicina, N: Netilmincina, S: Sisomicina, T: Tobramicina.

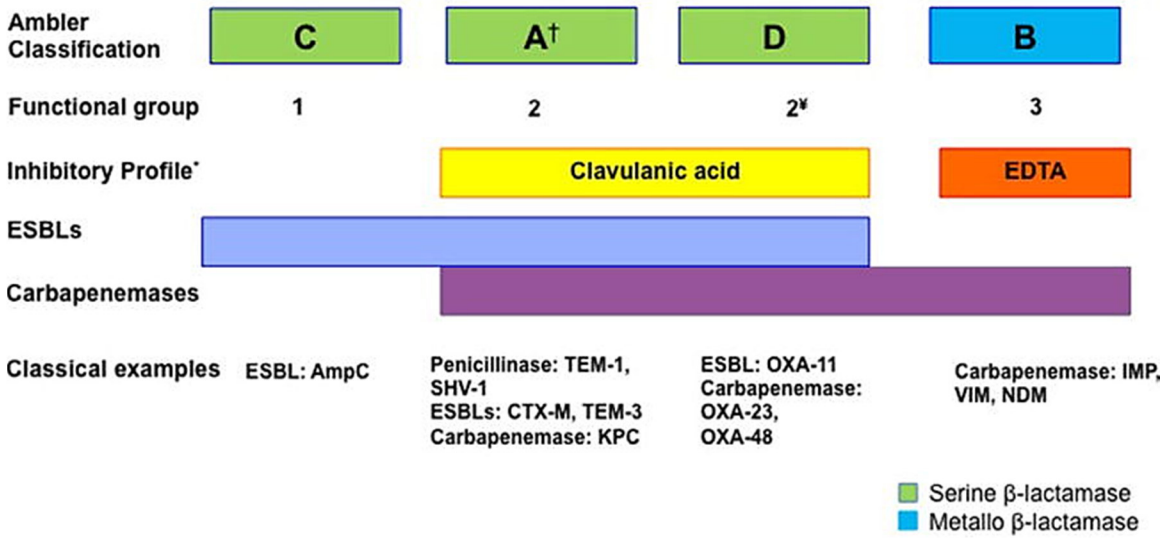
2.4.3 Destrucción de la molécula antibiótica

La destrucción del antibiótico mediante el uso de enzimas es el principal mecanismo de resistencia a los β-lactámicos, por la acción de las β-lactamasas. Estas enzimas destruyen el enlace amida del anillo de β-lactámico como penicilinas, monobactams, y carbapenems (Öztürk *et al.*, 2015). Las β-lactamasas se describieron por primera vez a principios de la década de 1940, un año antes de que se introdujera la penicilina en el mercado (Abraham y Chain, 1988; D'Costa *et al.*, 2011). Sin embargo, diversos estudios han señalado que estas enzimas o precursores relacionados, han estado presentes en fuentes naturales mucho antes, proveyendo un ambiente protector para los microorganismos capaces de producirlos (Medeiros, 1997). Es indiscutible que la prevalencia y variedad de β-lactamasas se han multiplicado dramáticamente en los últimos años con el uso de β-lactámicos de manera terapeútica (Knapp *et al.*, 2010).

Como un ejemplo, las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina se volvieron clínicamente relevantes después de que la penicilina se hizo ampliamente disponible y se descubrió que el mecanismo de resistencia era una penicilinasa codificada por plásmido que se transmitía fácilmente entre cepas, lo que producía una diseminación rápida del rasgo de resistencia (Karen Bush, 2013).

Para superar este problema, se fabricaron nuevos compuestos de β-lactámicos con un espectro de actividad más amplio y una menor susceptibilidad a las penicilinasas (como la ampicilina). Sin embargo, durante la década de 1960 se encontró una nueva β-lactamasa codificada por plásmido capaz de hidrolizar la ampicilina entre gramnegativos (denominada TEM-1 después del nombre del paciente en el que se encontró originalmente [Temoneira]) (Paterson y Bonomo, 2005). A partir de entonces, el desarrollo de nuevas generaciones de β-lactámicos ha seguido a la rápida aparición de enzimas capaces de hidrolizarlos, debido a la presión selectiva que nosotros realizamos sobre las comunidades microbianas (Munita y Arias, 2016).

Figura 4. Representación esquemática de las β-lactamasas (Munita y Arias, 2016). Clasificación moléculas de las β-lactamasas según el esquema de Ambler. En la figura se observa una correlación con los grupos funcionales de Bush y Jacoby. De esta última, no se muestran muchos subgrupos.



† *Enzimas de Clase A: penicilinasas, BLEE y carbapenemasas.*
¥ *Enzimas de Clase D que pertenecen al grupo funcional 2d.*
**EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; BLEE (ESBL): β-lactamasas de espectro extendido.*

Se han descrito más de 1,000 β-lactamasas diferentes y es probable que se sigan encontrando más, como parte normal del proceso de evolución bacteriana (Lahey, 2015). En los años 80 se introdujeron al mercado antibióticos β-lactámicos de amplio espectro e inhibidores de β-lactamasas (Bradford, 2001). Sin embargo ocurrió una rápida emergencia de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) con resistencia a cefalosporinas como ceftazidima y cefotaxime (Knothe *et al.*, 1983; Paterson y Bonomo, 2005).

Existen dos esquemas de clasificación de β-lactamasas mundialmente aceptados (Figura 4). En primer lugar, la clasificación de Ambler (1980) se basa en la identidad de la secuencia de aminoácidos y separa las β-lactamasas en 4 grupos (A-D). Por otro lado, la clasificación de Bush-Jacoby divide β-lactamasas en 3 categorías de acuerdo con su mfunción bioquímica, basada principalmente en la especificidad del sustrato (Bush y Jacoby, 2010; Bush, 2013).

El Grupo 1 contiene a las cefalosporinasas (correspondiente a la Clase C), el Grupo 2 contiene a las serin β-lactamasas (Clases A y D) y el Grupo 3 a las metalo β-lactamasas (Clase B), cada una dividida en varios grupos (Bush *et al*., 1995; Bush y Jacoby, 2010).

2.4.3.1 Betalactamasas AmpC

Las β-lactamasas AmpC son clínicamente significativas y confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas, oximino-cefalosporinas (por ejemplo, ceftriaxona, cefotaxima y ceftazidima), cefamicinas (por ejemplo, cefoxitina y cefotetan) y monobactamas. La actividad de AmpC no se ve afectada por el ácido clavulánico, inhibidor de BLEE.

En la clasificación estructural de Ambler pertenecen a la clase C, mientras que en el esquema de clasificación funcional de Bush *et al.* se asignaron al grupo 1 (Ambler 1980; Bush *et al.,* 1995; Cordron *et al.,* 2000; Phillipon *et al.,* 2002)

Los genes para AmpC se encuentran comúnmente ubicados en los cromosomas de varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Enterobacter*, *Shigella*, *Providencia*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* y *Escherichia coli*. En bacterias Gram-negativas, la producción de AmpC es mediada por cromosomas o plásmidos.

Los genes cromosómicos AmpC se expresan constitutivamente en un nivel bajo. Algunas *Enterobacteriaceae*, como las especies *Enterobacter, Citrobacter* spp. y *Serratia* spp., portan un gen AmpC inducible. En estos casos, el gen está fuertemente inducido por β-lactámicos, como cefoxitina e imipenem, con expresión mediada por el regulador AmpR. Las mutaciones en el gen represor AmpD pueden conducir a la sobreproducción de AmpC β-lactamasas (Barnaud *et al.,* 1998; Thomson, 2001). Las enzimas AmpC no tienen efecto sobre cefalosporinas de 4ta generación, ni sobre carbapenémicos, siendo estos últimos los betalactámicos de elección en cepas productoras de AmpC (Pérez-Pérez y Hanson, 2002; Pai *et al.,* 2004). No son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Petrosino *et al.,* 2002).

Clasificación:

La clasificación de las enzimas AmpC varía según el criterio de localización e inducción del gen *ampC* (Rojas y Valle, 2009).

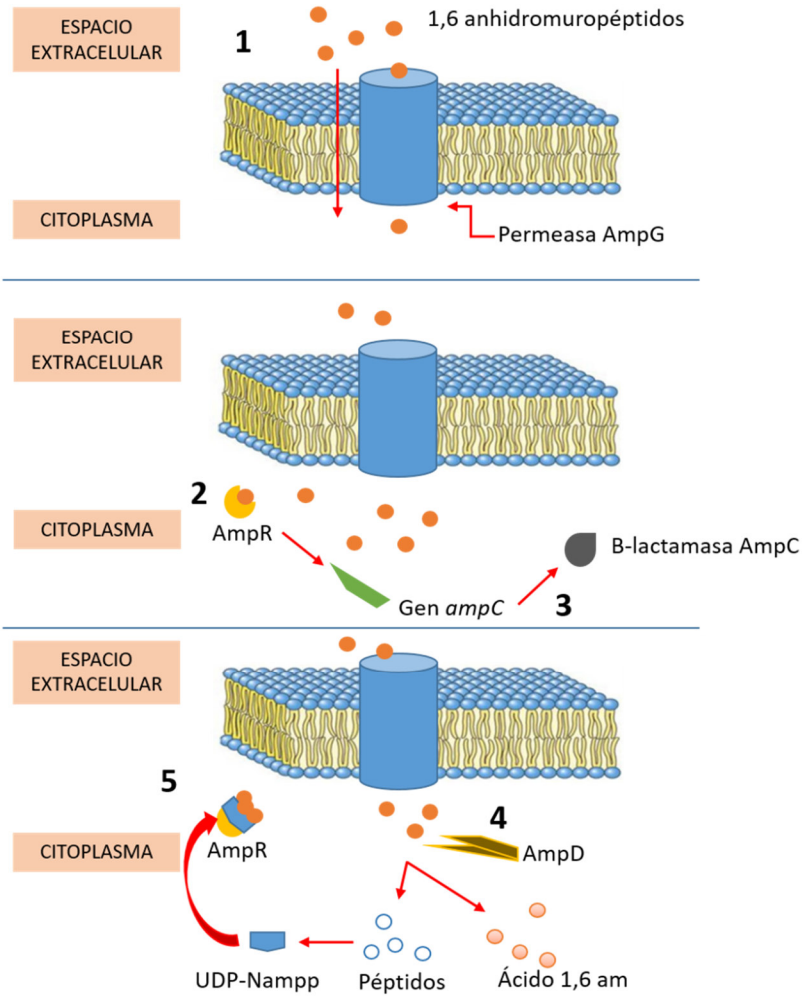
1. **AmpC cromosómica inducible:** ubicada en el cromosoma bacteriano, es producida a bajos niveles de manera natural. Su expresión y producción de la enzima aumenta en presencia de inductores β-lactámicos. Presente en: *Enterobacter* spp., *Morganella morganii, Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Vila y Marco, 2002).
2. **AmpC cromosómica no inducible:** ubicada en el cromosoma bacteriano y son conocidas como AmpC constitutivas. Se expresa a niveles muy bajos sin mostrar resistencia. Cuando hay hiperproducción, confieren resistencia a β-lactámicos a excepción de cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos. Presente en *Escherichia coli,* entre otras (Navarro *et al.,* 2002).
3. **AmpC plasmídicas inducibles y constitutivas:** ubicadas en el ADN plasmídico de las bacterias. Codificados por genes *ampC* presentes en *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis*. Son genes integrados en elementos transferibles facilitando la diseminación a diferentes microorganismos (Pérez-Pérez y Hanson, 2002; Schmidtke y Hanson, 2006).

Expresión

Existe un sistema molecular con la capacidad de regular la expresión del gen *ampC* y se encuentra altamente relacionado al sistema de reciclaje del peptidoglucano. Los productos de degradación de la pared bacterina (1,6 anhidromuropéptidos) ingresan al citoplasma bacteriano a través de una permeasa AmpG. Los productos de degradación actúan como molécula señal del activador transcripcional AmpR. Cuando este último se una a los productos de degradación (1,6 anhidromuropéptidos) la expresión del gen *ampC* resulta inducida. Debido a la inducción, ocurre la expresión de la enzima AmpC con efecto hidrolítico sobre β-lactámicos (Rojas y Valle, 2009). El sistema represor consiste en el clivaje de los productos (1,6 anhidromuropéptidos) por la enzima AmpD (amidasa) codificada por gen *amp*D. A partir de este proceso, se genera 1,6 anhidromurámico y péptidos. Estos últimos son procesados hasta tripéptidos y son reutilizados hasta formar el precursor de pared

bacteriana UDP-N-acetilmuramilpentapéptido. Este último al unirse con el activador transcripcional AmpR lo bloquea y se reprime la transcripción del gen *ampC* (Juan *et al.,* 2005; Suárez *et al.,* 2006). Los β-lactámicos inducen la producción de AmpC causando un incremento en la concentración de productos de degradación (1,6 anhidromuropéptidos) (Petrosino *et al.,* 2002). Las cepas salvajes productoras de AmpC lo hacen normalmente a nivel basal por su sistema represor. Por ello, mutaciones asociadas a los genes *ampR* y *ampD* resultan en la hiperproducción de AmpC (derrepresión) (Schmidtke y Hanson, 2006) (Figura 5).

Figura 5. Sistema de expresión y represión del gen *ampC* (Rojas y Valle, 2009).



1: Las moléculas de 1,6 anhidromuropéptidos (1,6 amp) ingresan al citoplasma a través de la permeasa AmpG. 2: Las moléculas de 1,6 anhidromuropéptidos se unen al activador transcripcional AmpR iniciándose la transcripción del gen *ampC*. 3: se produce la enzima AmpC. 4: sistema represor; la amidasa AmpD cliva a los 1,6 anhidromuropéptidos hasta péptidos y ácido 1,6 anhidromurámico (ácido 1,6 am). 5: los péptidos son reusados para la formación de UDP-N-acetilmuramilpentapéptido (UDP-Nampp), el cual se une a AmpR, bloqueándolo. En consecuencia, se reprime la transcripción del gen *ampC* y la síntesis de AmpC

2.4.4 Ingreso del antibiótico: Disminución de la permeabilidad

La mayoría de los antibióticos se dirigen a procesos/moléculas intracelulares y deben tener la capacidad penetrar la membrana citoplasmática o la membrana externa de las células bacterianas. En particular, la membrana externa de bacterias Gram-negativas proporciona una barrera formidable (Delcour, 2009). Las bacterias han desarrollado mecanismos para evitar que el antibiótico alcance su objetivo al disminuir la absorción de la molécula antimicrobiana. Este mecanismo es particularmente importante en las bacterias gram-negativas, lo que limita la afluencia de sustancias del medio externo. De hecho, la membrana externa actúa como la primera línea de defensa contra la penetración de múltiples compuestos tóxicos, incluidos varios agentes antimicrobianos (Munita y Arias, 2016).

Existen esencialmente dos vías que los antibióticos pueden tomar a través de la membrana externa: una vía mediada por lípidos para antibióticos hidrófobos, y otra por porinas de difusión general para antibióticos hidrófilos. Las composiciones de lípidos y proteínas de la membrana externa tienen un fuerte impacto en la sensibilidad de las bacterias a muchos tipos de antibióticos, y la resistencia a los medicamentos que implican modificaciones de estas macromoléculas es común (Delcour, 2009).

La membrana externa en bacterias gram-negativas es considerada la primera línea de defensa contra componentes tóxicos (Nikaido, 2003). Esta barrera está compuesta por una bicapa fosfolipídica impermeable a moléculas grandes y con carga. El paso de moléculas del exterior al espacio intracelular es mediado por porinas, permitiendo la penetración pasiva de moléculas hidrofílicas (Schulz, 2002; Nikaido, 2003; Delcour, 2009) (Figura 6). Los β-lactámicos, tetraciclinas y algunas fluoroquinilonas son ejemplos de antibióticos hidrofílicos que son afectados por cambios en la permeabilidad de la membrana externa (Pagès *et al.*, 2008).

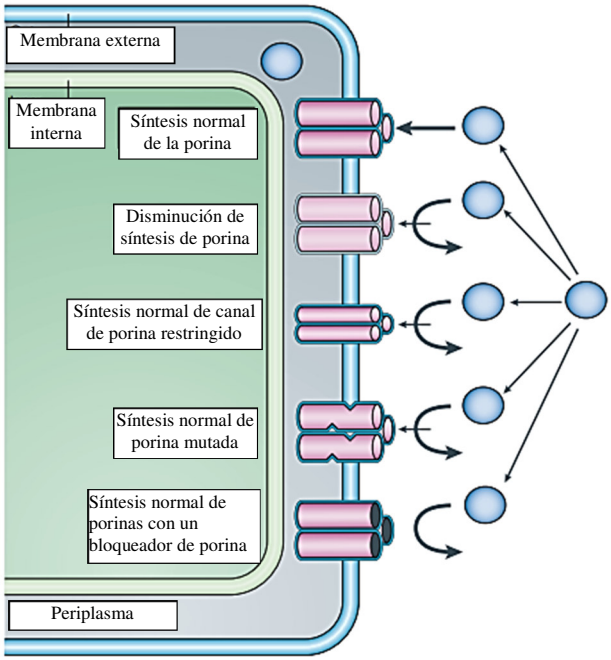
El principal ejemplo de la eficacia de esta barrera natural es el hecho de que la vancomicina, un antibiótico glucopéptido, no es activo contra organismos gram-negativos debido a la falta de penetración a través de la membrana externa. Del mismo modo, la resistencia natural de *Pseudomonas* y *Acinetobacter baumanii* a los β-lactámicos (en comparación con *Enterobacteriaceae*) puede explicarse, al menos

en parte, a un número reducido y / o expresión diferencial de porinas (Hancock y Brinkman, 2002).

Este mecanismo de resistencia se ha encontrado en diversas especies bacterianas como *Enterococcus cloacae, Salmonella* spp., *Neisseria gonorrhoeae, Acinetobacter baumanii* entre otros. Un ejemplo es *Pseudomonas aeruginosa* que posee una proteína de membrana externa aberrante denominada OprD, normalmente utilizada para la absorción de aminoácidos básicos y antibióticos (como el imipenem, un potente antibiótico utilizado contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*).

Las mutaciones del gen *oprD* surgen en aislados clínicos de *P. aeruginosa* durante el tratamiento (Quinn *et al*., 1986). Otro ejemplo demuestran las cepas de *Klebsiella pneumoniae* posterior a una terapia antibiótica. Se ha encontrado que aislados post-tratamiento exhiben un cambio en expresión de porinas OmpK35 y Omp36, evento relacionado con la disminución de 4-8 veces en la sensibilidad a una amplia gama de β-lactámicos (Doménech-Sánchez *et al*., 2003; Hasdemir *et al.*, 2004).

Figura 6. Mecanismos de resistencia a antibióticos asociados a la modificación de porinas (Pagès *et al*., 2008)**.**



Las moléculas de β-lactámicos y los trímeros de porinas están representados por círculos azules y cilindros rosa, respectivamente. El grosor de las flechas representa el nivel de penetración de los β-lactámicos por las porinas. Las flechas curvas ilustran la falla de captación que ocurre con: un cambio (disminución) del nivel de expresión de porinas, un intercambio del tipo de porina expresada y la mutación/modificación que perjudica las propiedades funcionales de los canales de porinas. El efecto de las moléculas bloqueadoras de porinas (círculo negros) se muestran en la parte inferios de la figura.

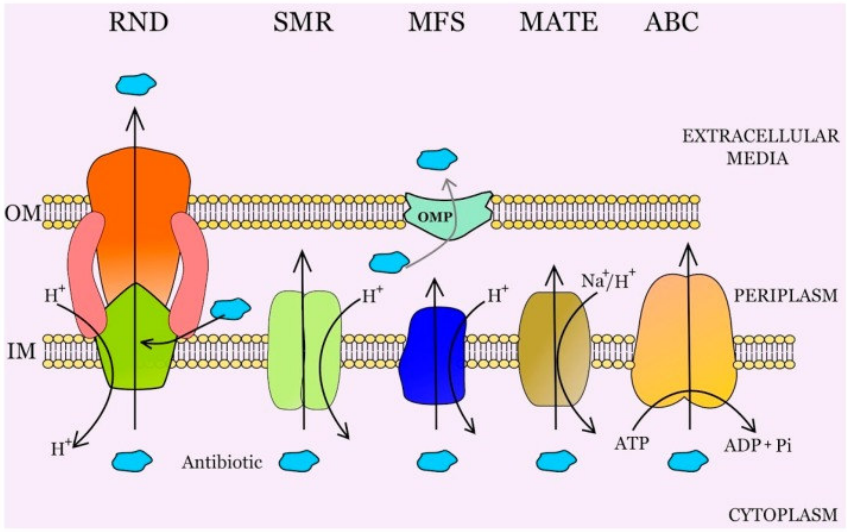
2.4.5 Bombas de eflujo

La producción de maquinarias bacterianas complejas capaces de transportar un compuesto tóxico fuera de la célula también puede producir resistencia a los antimicrobianos. Estas bombas no sólo transportan al exterior las moléculas antibióticas, también llevan a la adquisición de mecanismos de resistencia disminuyendo la concentración del antibiótico intracelular y promoviendo el acúmulo de mutaciones (Sun *et al.*, 2014; Munita y Arias, 2016).

Adicionalmente, existe evidencia que sugiere que las bombas de eflujo también tienen funciones fisiológicas y que su expresión va ligada a una respuesta a señales ambientales y fisiológicas (Sun *et al.*, 2014). En 1980 se describió en *Escherichia coli* la capacidad de bombear al exterior tetraciclina mediante una bomba de eflujo (McMurry *et al.*, 1980). Desde entonces, muchas clases de estas bombas han sido caracterizadas en bacterias gram-positivas y gram-negativas. Estos sistemas pueden ser sustrato-específicos o con capacidad de movilizar una amplia variedad de moléculas, como en las bacterias multridogorresistentes (MDR) (Poole, 2005).

Hay 5 familias principales de bombas de eflujo (Figura 7), que incluyen 1) la superfamilia facilitadora principal (MFS), 2) la familia de resistencia a múltiples fármacos (SMR), 3) la familia de división de células nodulares de resistencia (RND), 4)familia de cassettes de unión a ATP (ABC), y 5) la familia de extrusión de compuestos múltiples y tóxicos (MATE). Estas familias difieren en términos de conformación estructural, fuente de energía, rango de sustratos que pueden extruir y en el tipo de organismos bacterianos en los que se distribuyen (Piddock, 2006).

Figura 7. Representación esquemática de los principales tipos de sistemas de eflujo bacterianos (Blanco *et al*., 2016).



Cinco familias de transporadores de eflujo: RND (familia de división de células nodulares de resistencia), SMR (familia de resistencia a múltiples fármacos), MFS (familia facilitadora principal), MATE (familia de extrusión de compuestos múltiples y tóxicos) y ABC (familia de cassettes de unión a ATP). IM= membrana interna, OM= membrane externa, OMP: proteína de membrane externa.

2.4.6 Cambios en la molécula diana

Una estrategia común para que las bacterias desarrollen resistencia antimicrobiana es evitar la acción del antibiótico interfiriendo con su molécula diana objetivo. Para lograr esto, las bacterias han desarrollado diferentes tácticas, que incluyen la protección del objetivo (evitando que el antibiótico llegue a su sitio de unión) y modificaciones del sitio objetivo que resultan en una disminución de la afinidad por la molécula de antibiótico (Munita y Arias, 2016).

2.4.7 Protección

Los antibióticos afectados por este mecanismo son la tetraciclina (Tet [M] y Tet [O], fluoroquinolonas (Qnr), ácido fusídico (FusB y FusC) entre otros. Por ejemplo, Tet (M) fue descrito inicialmente en *Streptococcus* spp. y Tet (O) en *Campylobacter jejuni.* En la actualidad se encuentran ampliamente distribuidos entre diferentes especies bacterianas, probablemente debido a su ubicación en plásmidos y transposones conjugativos (Connell, Tracz *et al.*, 2003). Ambos interactúan a nivel ribosomal y 'desalojan' a la tetraciclina de su sitio de unión utilizando GTP

impidiendo así su acción (Dönhöfer *et al*., 2012; Li *et al*., 2013). Otro ejemplo es la proteína Qnr, un determinante de resistencia a fluoroquinolonas mediado por plásmidos. Fue inicialmente descrito en un aislado de *Klebsiella penumoniae* en 1990 (Martínez-Martínez *et al.,* 1998). Actúa como un homólogo de ADN que compite por el sitio de unión de ADN de la ADN-girasa y topoisomerasa IV. La disminución de esta interacción disminuye las oportunidades de la quinolona para formar y estabilizar el complejo ADN-quinilona (Rodríguez *et al*. 2011).

2.4.8 Modificación

La introducción de modificaciones en el sitio objetivo es uno de los mecanismos más comunes de resistencia a antibióticos en patógenos bacterianos. Estos cambios diana pueden consistir en 1) mutaciones puntuales en los genes que codifican el sitio diana, 2) alteraciones enzimáticas del sitio de unión y 3) reemplazo o derivación del objetivo original. El resultado es la disminución de la afinidad del antibiótico con su diana (Munita y Arias, 2016).

2.4. 8.1 Mutaciones del sitio blanco

Un ejemplo bien caracterizado de resistencia son las mutaciones de resistencia a fluoroquinolonas. Esta familia de antibióticos interrumpe la replicación del ADN mediante la inhibición de dos enzimas cruciales: ADN girasa y topoisomerasa IV. El desarrollo de mutaciones cromosómicas en los genes *gyr*A (ADN girasa) y *par*C-*par*E (topoisomerasa IV) es el mecanismo más frecuente de resistencia adquirida a las fluoroquinolonas (Ito *et al.*, 1994; Hooper, 2002; Vakili *et al* .,2014)

2.4.8.2 Alteración enzimática del sitio blanco

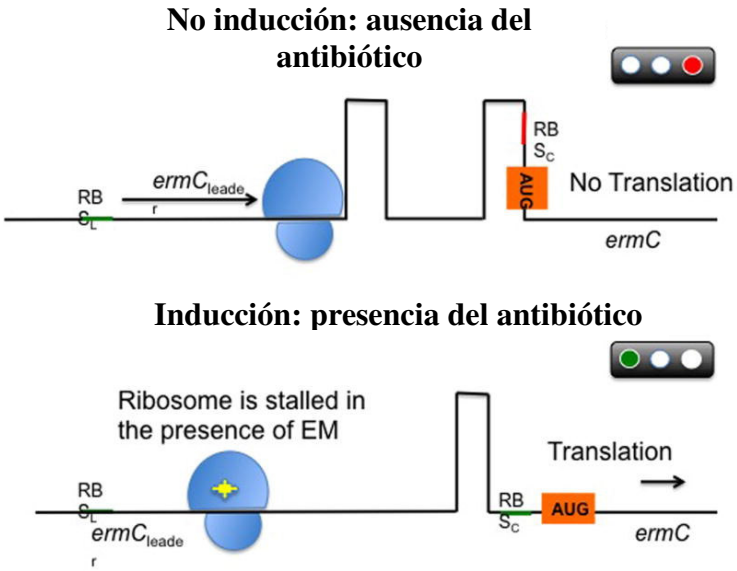
Un ejemplo es la metilación del ribosoma catalizado por una enzima codificada por los genes *erm* (metilación ribosómica de la eritromicina), que da como resultado resistencia a los macrólidos. Estas enzimas son capaces de mono o dimetilar un residuo de adenina en la posición A2058 del dominio V del ARN 23r de la subunidad ribosómica 50S. Debido a este cambio bioquímico, la unión de la molécula antimicrobiana a su objetivo se ve afectada. Es importante destacar que, dado que los antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B tienen sitios de unión

superpuestos en el ARNr 23S, la expresión de los genes *erm* confiere resistencia cruzada a todos los miembros del grupo MLSB (macrólidos-lincosamidas-estreptogramina B) (Weisblum, 1995; Leclercq, 2002).

Estos genes están ampliamente distribuidos y ahora se han encontrado en más de 30 géneros bacterianos diferentes (Roberts, 2008). La resistencia mediada por Erm conlleva un importante costo de aptitud bacteriana debido a una traducción menos eficaz por parte del ribosoma metilado. Por lo tanto, aunque el fenotipo de MLSB puede expresarse de manera constitutiva, en la mayoría de los casos está sujeto a un control estricto a través de una compleja regulación génica post-transcripcional.

A través de este mecanismo, las bacterias que crecen en ausencia de antibióticos producen un transcrito de ARNm inactivo que no se puede traducir en la proteína deseada (en este caso, una metilasa). Por el contrario, en presencia de antibiótico, la transcripción se activa y el sistema está preparado para conferir resistencia rápida (Katz y Ashley, 2005) (Figura 8).

Figura 8. Representación esquemática de control post-transcripcional del gen *erm*C (Munita y Arias, 2016).



Bajo condiciones de no inducción, el péptido ErmC es producido y el gen ermC previene que el ribosoma reconozca el sitio de unión del ermC. Como resultado, la traducción es inhibida. Después de la exposición a eritromicina (estrella amarilla, EM), el antibiótico interactúa con el ribosoma, se une e impide el progreso de la traducción. Este fenómeno libera el sitio de unión de ermC y permite la traducción y su efecto, brindando resistencia antibiótica. RBSL, sitio de unión ribosomal líder; RBSC, sitio de unión ribosomal de ermC; AUG, codón de iniciación. Ribosoma representado en azul y eritromicina en amarillo.

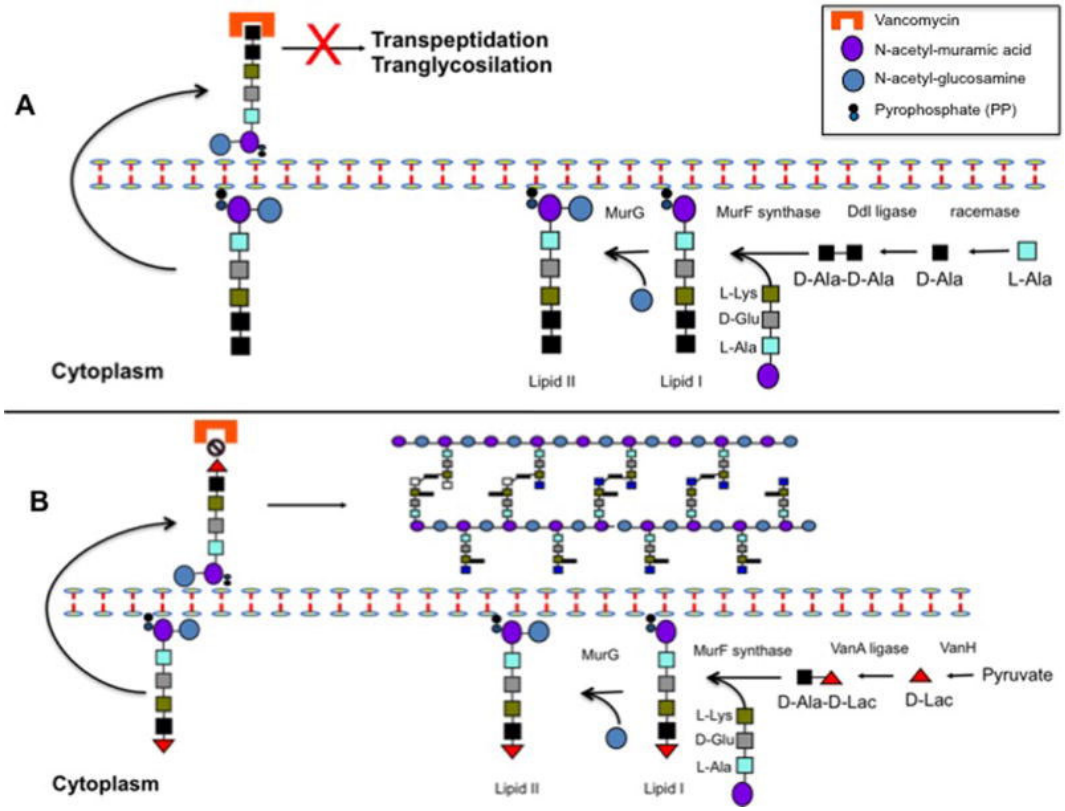
2.4.8.3 Reemplazo completo del sitio blanco

Usando esta estrategia, los ejemplos más relevantes incluyen la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus* debido a la adquisición de una PBP (proteína fijadora de penicilina) exógena (PBP2a) y resistencia a la vancomicina en los enterococos mediante modificaciones de la estructura del peptidoglicano mediada por los grupos de genes *van* (Munita y Arias, 2016). Los β-lactámicos tienen la capacidad de alterar la síntesis del peptidoglucano de la pared celular bacteriana mediante la inhibición de las PBP, responsables de la transpeptidación y transglicosilación del peptidoglucano (Heesemann, 1993; Koch, 2000; Kong *et al.*, 2010).

La resistencia a la meticilina en *S. aureus* es el resultado de la adquisición de un gen extraño (probablemente de *Staphylococcus sciuri*) designado *mec*A a menudo localizado en un fragmento de ADN denominado casete cromosómico estafilocócico (SCCmec). El gen *mec*A codifica PBP2a, una PBP que tiene baja afinidad por todos los β-lactámicos, incluidas las penicilinas, las cefalosporinas (excepto los compuestos de última generación) y los carbapenémicos (Arêde *et al.*, 2012; Munita y Arias, 2016).

Otro ejemplo importante de la estrategia de sustitución y derivación para lograr resistencia está relacionado con la resistencia a vancomicina. De forma similar a los β-lactámicos, los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) inhiben la síntesis de la pared celular. Los glucopéptidos no interactúan directamente con los PBP, se unen al terminal D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) de la fracción de pentapéptido de los precursores de peptidoglicano nacientes, resultando en la inhibición de la síntesis de la pared (Gardete y Tomasz, 2014; Faron *et al.,* 2016) (Figura 9).

Figura 9. Representación esquemática de la síntesis de peptidoglucano y mecanismos de acción (A) y resistencia (B) de la vancomicina (Munita y Arias, 2016)**.**



A representa la producción normal de peptidoglucano y muestra que la unión del antibiótico a la D-Ala-D-Ala terminal de los precursores de peptidoglucano impide la transpeptidación y transglicosilación. B muestra el cambio en la síntesis de peptidoglucano producido por la expresión del grupo de genes vanA. El cambio del dipéptido terminal de D-Ala-D-Ala a D-Ala-D-Lac reduce notablemente la unión de vancomicina al objetivo de peptidoglucano permitiendo que continúe la síntesis de la pared celular.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

El estudio consistió en la detección fenotípica de los mecanismos de resistencia antimicrobiana de Betalactámicos (Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y Betalactamasas tipo AmpC plasmídica (AmpC)), a aminoglucósidos y a quinolonas en 36 aislados de *Escherichia coli* los cuales se obtuvieron desde el año 2010 en adelante del cepario del Laboratorio de bacteriología y micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos e identificados mediante pruebas bioquímicas.

3.2 Lugar de ejecución y periodo de duración

Las pruebas de sensibilidad se realizaron en la Sección de Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante el año 2016.

3.3 Descripción y tamaño de muestra

Se trabajó con 36 aislados de *Escherichia coli* procedentes de porcinos en su mayoría lechones de granjas tecnificadas. Las muestras remitidas al laboratorio fueron órganos de necropsias (hígado, bazo, vesícula biliar, intestinos, pulmón y linfonódulos), estos fueron procesados, aislándose *Escherichia coli* para luego ser preservadas. Los aislados se obtuvieron del cepario conservados en criotecas a temperaturas de congelación. Cada aislado fue identificado mediante pruebas de bioquímicas en la Sección de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.4 Materiales, Equipos, Reactivos y Medios de Cultivo

- Mechero, asa bacteriológica, portaobjetos, placas Petri 100 x 15 mm estériles, gradillas, tubos de vidrio estériles, estufa para incubación a 37°C
- Hisopos estériles, escala de Mc Farland a 0.5 (1.5 x 10^8 UFC/ml), solución salina 0.85%, discos de antibióticos.
- Agar Mueller – Hinton (MH), agar Tripticasa de Soya (TSA), agar MacConkey (MC), caldo úrea, medio SIM, agar Hierro tres azúcares (TSI), agar Citrato de Simmons, agar Lisina(LIA), reactivo de Kovac's.

3.5 Identificación de las muestras

Cuadro 2. Identificación de los aislados de *Escherichia coli.*

CODIGO	FECHA DE CONSERVACIÓN	CODIGO	FECHA DE CONSERVACIÓN
EC4	12/08/2011	**EC29**	08/08/2012
EC5	12/08/2011	**EC41**	05/03/2013
EC6	12/08/2011	**EC43**	17/08/2013
EC7	21/06/2011	**EC44**	19/09/2013
EC8	21/06/2011	**EC45**	19/09/2013
EC9	21/06/2011	**EC46**	26/09/2013
EC10	08/04/2011	**EC53**	10/01/2014
EC11	20/06/2011	**EC57**	05/03/2014
EC12	15/07/2011	**EC61**	22/07/2014
EC13	12/08/2011	**EC63**	20/08/2014
EC14	12/08/2011	**EC65**	01/10/2014
EC15	19/08/2011	**EC74**	28/11/2014
EC16	26/08/2011	**EC77**	30/01/2015
EC17	26/08/2011	**EC78**	30/01/2015
EC18	10/11/2010	**EC79**	18/02/2015
EC19	08/01/2011	**EC81**	18/02/2015
EC20	15/10/2011	**EC83**	06/03/2015
EC23	23/01/2011	**EC106**	10/09/2015

3.6. Procesamiento de las Muestras

3.6.1 Reactivación de aislados:

Los aislados de *Escherichia coli* pertenecientes al cepario se encuentran criopreservados en viales de 1.5ml utilizando caldo de cultivo Tripticasa de Soya (TSB) y Glicerol al 87%, en una proporción 50/50. En esta parte del estudio se reactivaron los aislados, mediante la siembra en agar nutritivo Tripticasa de Soya (TSA) y Agar MacConkey (MC) (Sánchez y Corrales; 2005)

3.6.2 Pruebas Bioquímicas

Posterior a la reactivación de los aislados se inocularon en los siguientes medios:

- **Agar Hierro tres azúcares (TSI), Lisina (LIA) y Citrato de Simmons:** Se realizó con el ansa para punción, por picadura hasta el fondo del agar y por estría en la superficie del pico de flauta.

-**SIM**: Con el ansa de punción, se sembraron en picadura en el centro y hasta el fondo del tubo.

-**Caldos úrea**: Con el ansa circular se suspendieron colonias bacterianas.

Se incubaron en estufa a 37°C por 24 horas. La interpretación se realizó basada en el Manual de Bacteriología Bergey's 2005.

3.6.3 Estudios de sensibilidad

Difusión en agar: Método de Kirby Bauer

La reactivación en TSA de los aislados de *Escherichia*, da paso a la determinación de la resistencia a *Escherichia coli* a 15 antimicrobianos representativos de las distintas familias, se utilizó la técnica Kirby Bauer de difusión en agar, esta técnica define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado, el cual refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana (de Toro *et al*., 2014). Se realizó e interpretó siguiendo las recomendaciones del CLSI 2016.

Se prepara una suspensión bacteriana en solución salina (0.9%) a una turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland a partir del cultivo fresco. Con un hisopo estéril, se inocula de manera homogénea sobre la superficie de una placa de Agar Mueller Hinton, y se colocan los discos de antimicrobianos con las concentraciones recomendados por el CLSI. Las placas se incubaron a 37°C. Los halos de inhibición producidos fueron leidos a las 18-24 horas y la interpretación se realizó siguiendo los puntos de corte propuestos por el CLSI (Cuadro 3).

Cuadro 3. Antibióticos utilizados en la prueba de Kirby Bauer y puntos de corte considerados (CLSI, 2016)

FAMILIA DE ANTIBIÓTICO	ANTIBIÓTICO	Concentración	Halo de inhibición (mm)		
		(ug/disco)	R	I	S
BETALACTÁMICOS	Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)	20 + 10	≤ 13	14-17	≥ 18
	Aztreonam (AZ)	30	≤ 17	18-20	≥ 21
	Cefepime (FEP)	30	≤ 18	17-24	≥ 25
	Cefotaxima (CTX)	30	≤ 22	15-22	≥ 26
	Cefoxitina (FOX)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
	Ceftazidima (CAZ)	30	≤ 17	18-20	≥ 21
	Ceftriaxona (CRO)	30	≤ 19	14-20	≥ 23
	Cloxacilina (CX)	1	≤ 10	11--12	≥ 13
AMINOGLUCOSIDOS	Amikacina (MK)	30	≤ 14	15-16	≥ 17
	Gentamicina (GE)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
	Neomicina (N)	30	≤ 12	13-16	≥ 17
	Tobramicina (NN)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
	Kanamicina (K)	30	≤ 13	14-17	≥ 18
QUINOLONAS	Ácido Nalidíxico (AN)	30	≤ 13	14-18	≥ 19
	Ciprofloxacina (CIP)	5	≤ 15	16-20	≥ 21

Halos de inhibición se interpretan con la denominación R: Resistencia, I: Intermedio, S: Sensibilidad

A) DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

-Detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Un grupo importante de betalactamasas son las BLEE que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia a penicilinas, oximinocefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni a carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), las BLEE al ser enzimas plasmídicas son eficientemente inhibidas por ácido clavulánico (AC) (Zemelman *et al*., 2002; Livermore, 2008)

La detección de BLEE se realiza mediante la capacidad de estas enzimas de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, disminuyendo por tanto la sensibilidad de la bacteria a estos antibacterianos que se pone de manifiesto en una disminución de los halos de inhibición cuando se realiza la técnica de difusión con discos.

La presencia de BLEE no solo se ve detectada por la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos sino también por el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas de espectro ampliado o los monobactámicos y el ácido clavulánico, situados de forma estratégica.

Para ello se utilizó el Método de Jarlier (Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología). En la cual las placas de agar Mueller Hinton fueron inoculadas con las cepas, a una turbidez de 0.5 en la escala de Mc farland. Se colocó un disco de amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) (20/10 μg) en el centro de una placa de Petri y alrededor, a 25 mm de distancia, discos de Ceftazidima (CAZ) (30 μg/dL), Cefotaxima (CTX) (30 μg) y Cefepime (CEP) (30 μg). De manera opcional se analizó el disco de (ATM) (30 μg). La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor (AMC) y los discos generando el efecto de huevo, cola de pez o balón de futbol americano (Jarlier *et al*., 1988; Calderón *et al*., 2002; Famiglietti *et al*., 2005; Lezameta *et al*. 2010).

-Detección de betalactamasas tipo AmpC

Las betalactamasas de la clase molecular C de Ambler (grupo 1 de la clasificación de Bush Jacoby Medeiros) se caracterizan por su espectro de hidrólisis (actividad cefalosporinasa) y por su perfil de inhibición. Las AmpC hidrolizan cefalosporinas de primera (cefalotina) y segunda generación (cefuroxima), incluidas las cefamicinas (cefoxitina y cefotetán) y, en menor medida, las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), mientras que generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y cefpiroma) y los carbapenémicos (imipenem y meropenem) (Jacoby, 2009; Navarro *et al*., 2010). No existen métodos fenotípicos estandarizados por el CLSI, para la detección de enzimas AmpC, no obstante, se han diseñado diversos procedimientos con elevada sensibilidad, para el estudio se utilizaron 2 métodos:

- **Método de aproximación de discos:**

Propuesto en 1979 por Sanders y Sanders el cual es aplicable a betalactamasas AmpC inducibles. Realizamos un antibiograma convencional para luego colocar un disco de cefoxitina o cualquier otro antimicrobiano inductor (cefoxitin, ácido clavulánico, cefalosporinas de primera generación), a una distancia de 27 mm centro a centro del antimicrobiano sustrato, revelador o testigo. En el estudio se utilizó Cefoxitina (FOX) (30 µg/dL) como inductor con Ceftazidima (CAZ) (30 µg/dL) y ceftriaxona (CRO) (30 µg/dL) como reveladores. El microorganismo producirá una betalactamasa inducible si se observa una halo de inhibición truncado del antimicrobiano sustrato, testigo o revelador (Perozo *et al.,* 2005; Rojas y Valle, 2009).

- **Detección de AmpC usando inhibidores específicos:**

En caso de cepas derreprimidas, hiperproductoras o con beta-lactamasas AmpC plasmídicas constitutivas, el método de aproximación de discos no útil. Adicionaremos técnicas que incluyan la utilización de inhibidores de AmpC. La Cloxacilina, constituye un inhibidor de AmpC, la técnica consiste en colocar un disco de Cloxacilina (CX) (500ug) y a ambos lados, discos de Ceftazidima (CAZ) (30ug) y Cefotaxima (CTX) (30ug) a una distancia de 25mm centro-centro de cada

disco. La interpretación da como prueba positiva para la producción de AmpC cuando se observa un halo de inhibición de las cefalosporinas adyacente a la cloxacilina (Mirelis *et al*., 2006; Rojas y Valle, 2009).

B) DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS

La resistencia se alcanza por una acumulación de mutaciones en los genes de las topoisomerasas, sobre todo en gyrA y parC. Dichas mutaciones se concentran en una región denominada QRDR (quinolone resistance determining region), que codifican aminoácidos próximos al sitio activo de ambas enzimas (Ruiz, 2003; Jacoby, 2005; Navarro *et al*., 2011).

Los mecanismos cromosómicos de resistencia van apareciendo secuencialmente, el uso de quinolonas es uno de los factores de mayor importancia en la selección de aislados con resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas. Algunas enterobacterias presentan sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas siendo sensibles a ácido nalidíxico, situación que casos se ha relacionado con la presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas (Jacoby, 2005; Navarro *et al*.,2011).

Los resultados de la sensibilidad y resistencia al ciprofloxacino y ácido nalidíxico son importantes y necesarios para el estudio de mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias. Para la interpretación se utilizarán 3 protocolos preestablecidos (Navarro *et al*., 2011):

a) Resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacino. Presumiblemente presentan ya una mutación en gyrA, por lo que es importante informar el riesgo de seleccionar mutantes con resistencia a fluoroquinolonas tras tratamiento con las mismas en este tipo de cepas.

b) Resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad intermedia a ciprofloxacino. Muy probablemente son aislados con al menos dos mutaciones en gyrA o gyrA+parC. Ello implica resistencia a todas las fluoroquinolonas, independientemente de su posible sensibilidad *in vitro* a alguna de ellas. La

resistencia a una fluoroquinolona invariablemente conlleva una sensibilidad disminuida al resto de las fluoroquinolonas.

c) Resistencia al ácido nalidíxico y ciprofloxacino. Este fenotipo sugiere con alta probabilidad la presencia de genes qnr y/o de otros genes plasmídicos, sin alteraciones adicionales en las topoisomerasas.

C) DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS

Existe una gran y diversa población de enzimas modificadoras de aminoglucósidos que actúan en todas las posiciones susceptibles sobre las estructuras de aminoglucósidos. Al probar la susceptibilidad de los aislados frente a una gama de aminoglucósidos clínicamente disponibles y experimentales, surge un patrón de resistencia que es exclusivo de una enzima específica. Este método ha sido denominado interpretación interpretativa (Livermore, 2008).

Para la detección de los distintos fenotipos de resistencia se recomienda el uso de los siguientes fármacos: amikacina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina y tobramicina (Navarro *et al*., 2010).

Un determinado patrón de resistencia puede sugerir la presencia de una determinada enzima inactivante de aminoglucósidos. Además, para interpretar el patrón de sensibilidad a los aminoglucósidos se debe estar alerta ante situaciones donde puede haber una débil expresión de la enzima.

Se tiene en cuenta que:

a) Ante una cepa sensible a amikacina, pero con sensibilidad intermedia o resistente a tobramicina o netilmicina y sensible a gentamicina debería interpretarse sensibilidad intermedia a amikacina, ya que puede tratarse de la producción de la enzima AAC (6').

b) Cuando se observa resistencia solo de la gentamicina, debe considerarse sensibilidad intermedia a gentamicina por producción de la enzima AAC (3) I.

c) Si la gentamicina es resistente o presenta un halo de inhibición reducido y en la tobramicina también se observa resistencia o reducción del halo de

inhibición, debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la tobramicina pues puede estar presente la enzima ANT (2").

d) Debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la netilmicina cuando haya una reducción del diámetro de inhibición (comprendido entre 19 y 22mm), si también aparecen reducidos los halos de la gentamicina y la tobramicina, pues puede estar presente la enzima AAC (3) II o AAC (3)IV.

Cuadro 4. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a Aminoglucósidos

Fenotipo	**Clásico**	**AAC(3)I**	**AAC(3)II**	**AAC(3)IV**	**AAC(6')**	**ANT(2')**	**APH(3')**
Gentamicina	S	R	R	R	S/r	R	S
Tobramicina	S	S	R	R	R	R	S
Amikacina	S	S	S	S	R	S	S
Kanamicina	S	S	R	r	R	R	R
Neomicina	S	S	S	R	R	S	R

AAC = Acetiltransferasa, ANT = Adeniltransferasa, APH = Fosfotransferasas, Clásico = fenotipo histórico de la especie sin resistencia adquirida, S = susceptibles, R = resistente, r = zonas reducidas, pero es probable que permanezcan susceptibles en puntos de corte estándar. Adaptado de Livermore, 2008

IV RESULTADOS

El estudio se realizó con el fin de detectar fenotípicamente mecanismos de resistencia antimicrobiana en 36 aislados de *Escherichia coli* mediante la técnica Kirby Bauer.

Los resultados indicaron que de los 36 aislados de *Escherichia coli,* el 100% (36/36), fueron resistentes a por lo menos un antibiótico.

Los análisis fenotípicos de mecanismos de resistencia se realizaron en base a las normas de CLSI (2016) mediante el uso de la técnica Kirby Bauer. Cuyos resultados se expresaron como Sensible, Intermedio o Resistente (Cuadro 5 y Figura 10).

En el estudio, las frecuencias más altas de resistencia fueron al ácido nalidixico 89%(32/36), cloxacilina 83% (30/36) y amoxicilina-ácido clavulánico 69%(25/36). No se encontraron aislados que no presentaran resistencia a por lo menos un fármaco.

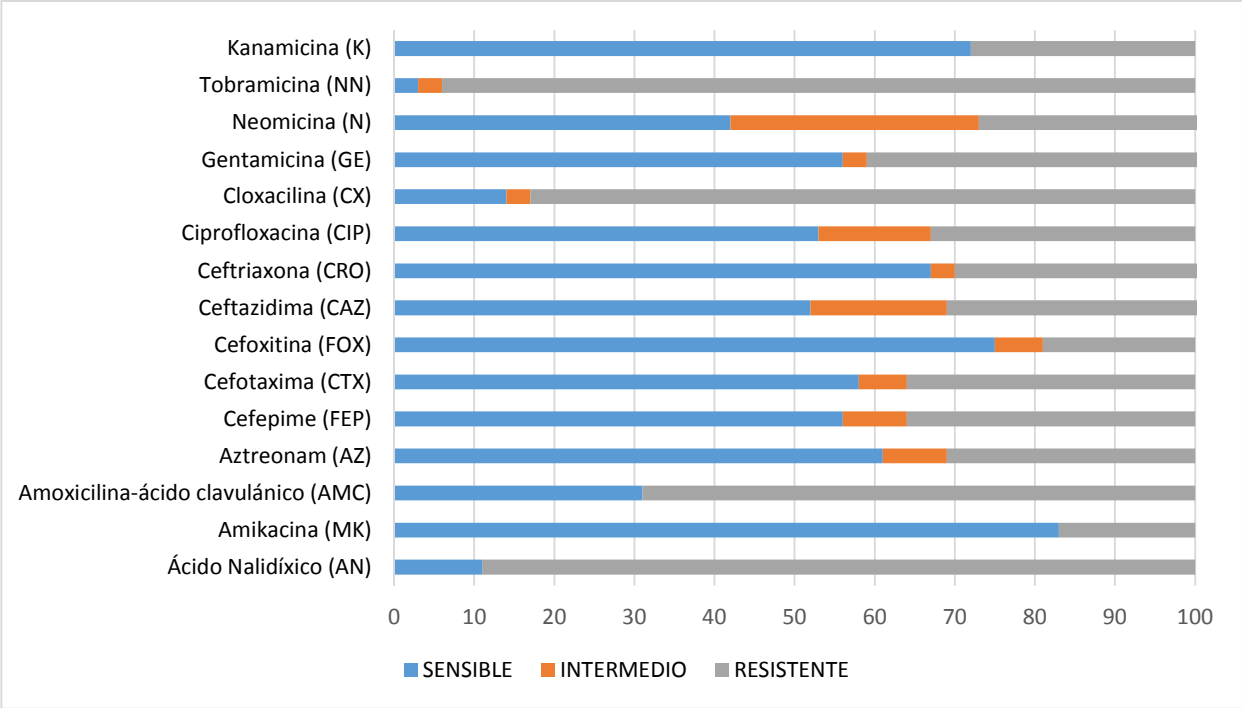
En la detección fenotípica de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se utilizaron aztreonam, cefotaxima, cefepime, ceftazidima y amoxicilina-ácido clavulánico, que por el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas o los monobactámicos y el ácido clavulánico situados de forma estratégica evidenciarían la formación del efecto cola de pez o balón de futbol americano. Del total de aislados no se encontraron BLEE, 0% (0/50).

Cuadro 5. Frecuencia absoluta y relativa de la susceptibilidad de *Escherichia coli* a los antibióticos.

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE		INTERMEDIO		RESISTENTE	
	n	%	n	%	n	%
Ácido Nalidíxico (AN)	4	11	0	0	32	89
Amikacina (MK)	30	83	0	0	6	17
Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)	11	31	0	0	25	69
Aztreonam (AZ)	22	61	3	8	11	31
Cefepime (FEP)	20	56	3	8	13	36
Cefotaxima (CTX)	21	58	2	6	13	36
Cefoxitina (FOX)	27	75	2	6	7	19
Ceftazidima (CAZ)	19	53	5	14	12	33
Ceftriaxona (CRO)	24	67	1	3	11	31
Ciprofloxacina (CIP)	19	53	5	14	12	33
Cloxacilina (CX)	5	14	1	3	30	83
Gentamicina (GE)	20	56	1	3	15	42
Neomicina (N)	15	42	11	31	10	28
Tobramicina (NN)	1	3	1	3	34	94
Kanamicina (K)	26	72	0	0	10	28

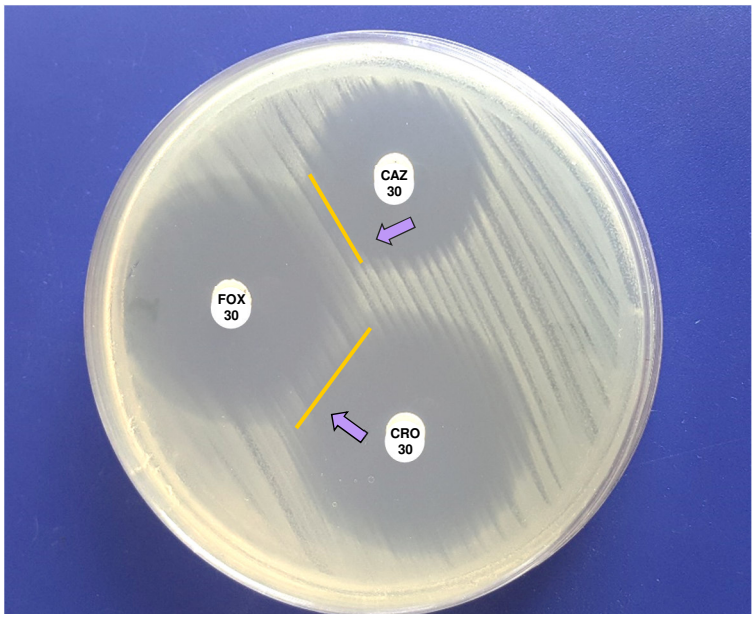
n: Número absoluto, %: Porcentaje

Figura 10. Porcentajes de aislados de *Escherichia coli* sensibles, intermedios y resistentes frente a los antibióticos probados.



En la detección de betalactamas AmpC, se utilizaron dos métodos: aproximación de discos y el uso de inhibidores específicos. De los 36 aislados estudiados el 3% (1/36), presentó un fenotipo de resistencia compatible (Figura 11).

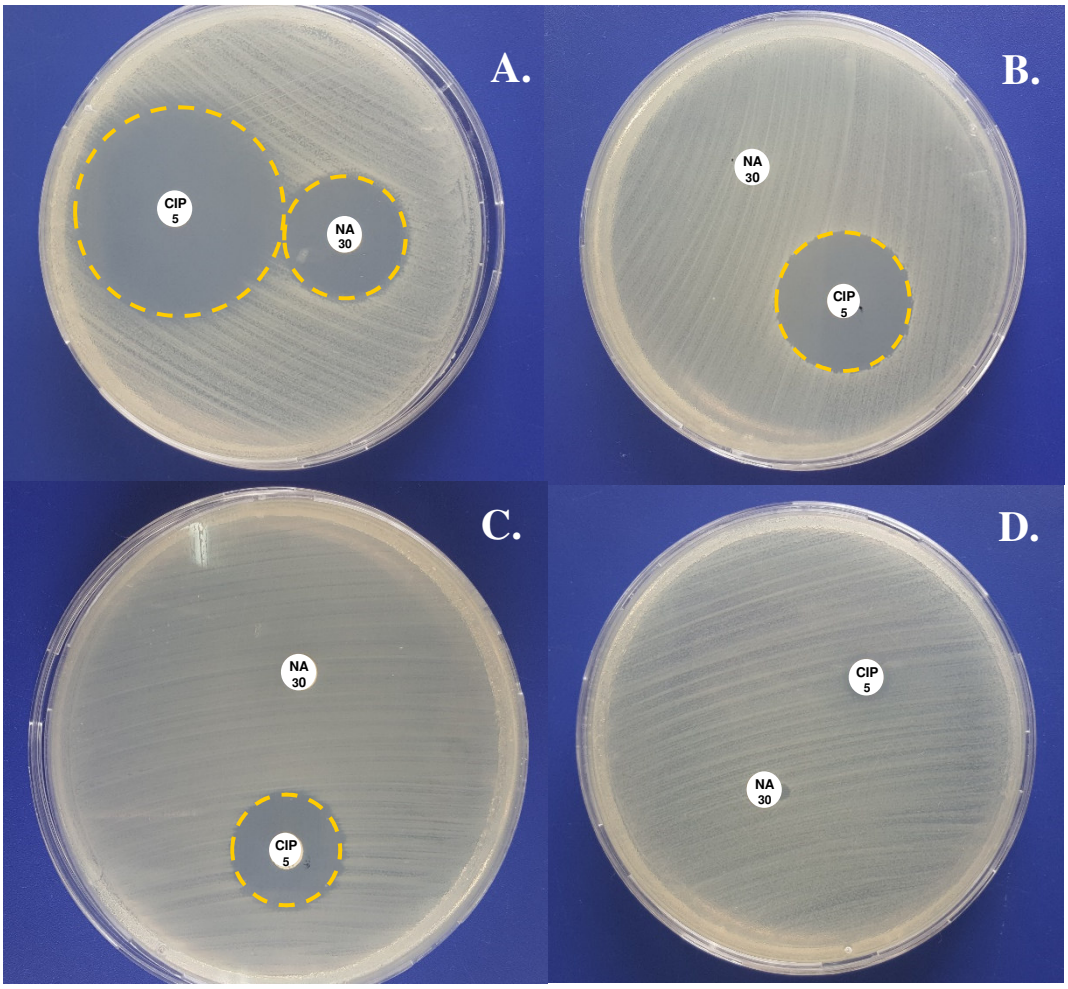
Figura 11. Método de detección de AmpC de tipo inducible usando el método de aproximación de discos.



FOX: Cefoxitina, CAZ: ceftazidima, CRO: Ceftriaxona

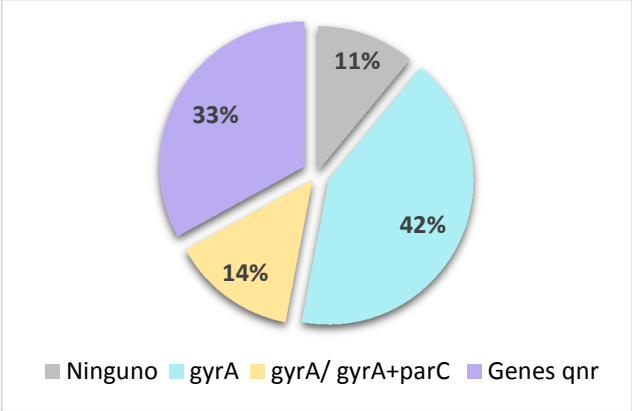
Para la detección fenotípica de los mecanismos de resistencia a quinolonas se compararon los resultados de la sensibilidad y resistencia al ciprofloxacino y ácido nalidíxico, los cuales evidencian las posibles mutaciones en los genes de las topoisomerasas (gyrA y parC). De los 36 aislados el 11% (4/36) no evidenció mecanismos de resistencia a quinolonas, siendo sensible a ambos antibióticos, el 42% (15/36) presentó resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacina lo cual evidencia una mutación en gyrA, el 14% (5/36) presentó resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad intermedia a ciprofloxacino evidenciando al menos dos mutaciones en gyrA o gyrA+parC, además el 33% (12/36) presentó resistencia al ácido nalidíxico y ciprofloxacino lo cual sugiere una alta probabilidad la presencia de genes qnr (Figura 12 y 13).

Figura 12. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana para quinolonas en aislados de *Escherichia coli*.



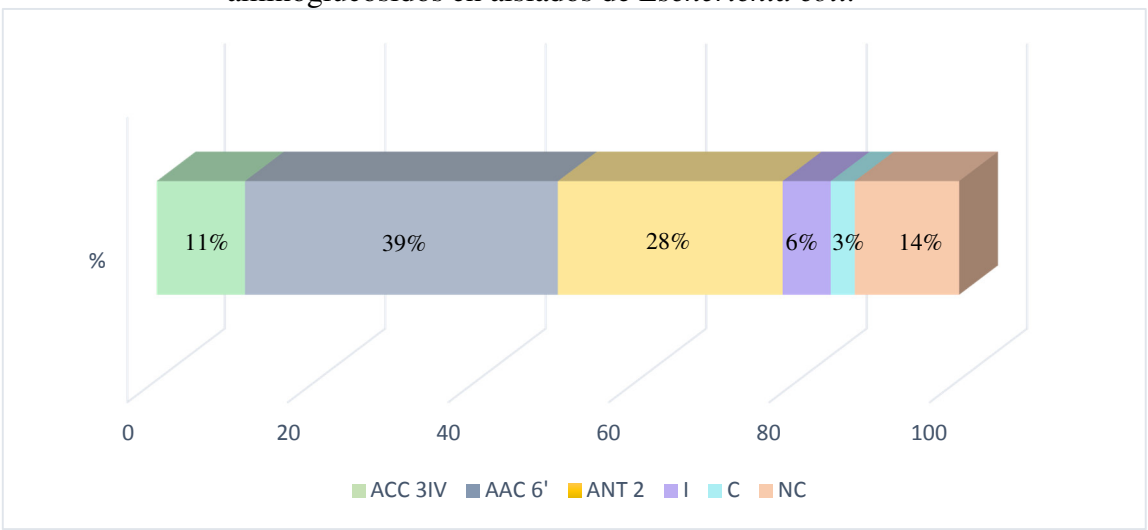
CIP: Ciprofloxacina, NA: Ácido nalidíxico A. Sensibilidad a CIP y NA, B. Resistencia a NA y sensibilidad a CIP, C. Resistencia a NA e intermedio para CIP, D. Resistencia a CIP y NA.

Figura 13. Porcentajes de tipo de mecanismo de resistencia a quinolonas, posibles mutaciones genéticas en gyr A, gyrA+parC o presencia del gen qnr



Por último para la detección fenotípica de los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos se utilizó amikacina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina y tobramicina los cuales fueron interpretados según el patrón de resistencia que generaron, sugiriendo la presencia de una determinada enzima inactivante de aminoglucósidos. De los 36 aislados estudiados presentaron un patrón de resistencia de 39% (14/36) para la enzima AAC (6'), 28% (10/36) para la enzima ANT (2"), 11% (4/36) para la enzima AAC (3) IV, en tanto que un 3% (1/36) presentó un patrón clásico sin resistencia adquirida, un 6% (2/36) presentaron resistencia a todos los antibióticos (Impermeabilidad) y el 14% (5/36) no presentó compatibilidad con ninguno de los patrones preestablecidos (Figura 14).

Figura 14. Distribución porcentual de mecanismos de resistencia antimicrobiana a aminoglucósidos en aislados de *Escherichia coli.*



I: Impermeabilidad, C: Clásico, NC: No compatible con patrón preestablecido

V.DISCUSIÓN

El estudio muestra altos porcentajes de resistencia al ácido nalidíxico 89%(32/36), cloxacilina 83% (30/36) y amoxicilina-ácido clavulánico 69%(25/36). El ácido nalidíxico rara vez se utiliza hoy en día debido a su toxicidad (Rubinstein, 2001), sin embargo su uso se aplica en estudios de resistencia para evidenciar posibles mutaciones en genes como gyrA o parC, este alto porcentaje de resistencia es muy similar a lo descrito por Ruiz *et al*., (2004) que reporta un 91% de resistencia, en el cual basta la mutación en gyrA para generar resistencia a este antibiótico

Seral *et al*., (2010) describe que la sensibilidad a la amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) descarta, en principio la betalactamasa de tipo AmpC y más bien apunta a una BLEE como causa de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, lo cual se corrobora en el presente estudio debido al gran porcentaje de resistencia a AMC (69%), relacionado a la aparición de betalactamasa de tipo AmpC (3%), sin embargo esta por sí sola no sería la causa, si bien la resistencia a esta combinación puede deberse a una elevada producción de BLEE, o a la existencia de BLEE resistentes a inhibidores, también existen otros múltiples mecanismos de resistencia que pueden coexistir o no con la BLEE, como IRTs, enzimas OXA, hiperproducción de SHV-1, TEM-1, K1,etc.

Los altos niveles de resistencia (69%) a AMC generan una gran preocupación desde el punto de vista clínico y epidemiológico ya que esta combinación antibiótica es el tratamiento antimicrobiano de primera elección para muchas infecciones por *Escherichia coli*. Además de ser recetado en muchos países debido a su amplio espectro de acción, es por ello que la resistencia a los inhibidores de betalactamasas entre aislamientos clínicos de enterobacterias es un problema mundial emergente (Oteo *et al*., 2008; Di Conza *et al*., 2014).

En la detección fenotípica de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se utilizaron aztreonam, cefotaxima, cefepime, ceftazidima y amoxicilina-ácido clavulánico, que por el efecto sinérgico situados de forma estratégica evidenciarían la formación del efecto cola de pez o balón de futbol americano. Del total de aislados no se encontraron BLEE, 0% (0/50), la OPS refiere que un alto nivel de resistencia puede impedir que la deformación pueda observarse, siendo importante el uso de otros métodos de detección complementaria como asociaciones de discos cefotaxima–ácido clavulánico y Ceftazidima-ácido clavulánico, así como el uso de tiras E-test.

Debido a la gran problemática de resistencia bacteriana ocasionada por bacterias productoras de BLEE, la CLSI recomienda investigar la producción de BLEE en cualquier aislamiento de *Escherichia coli* informándola como resistente a todos los betalactámicos, de manera que el clínico tenga las herramientas para tomar la decisión de que tratamiento llevar a cabo (Vila y Marco, 2010; Morote, 2015). Las opciones de tratamiento en infecciones originadas por bacterias gramnegativas productoras de BLEE son limitadas, ya que presentan resistencia a cefalosporinas incluyendo las de tercera y cuarta generación (Fariñas y Martínez-Martínez, 2013).

Cantón y Oliver (2003) describen que la mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE se han diseñado para *Escherichia coli* y *Klebsiella*, estos métodos se fundamentan en la inhibición de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas. Siendo importante la presencia, cada vez mayor, de BLEE en enterobacterias productoras de betalactamasas cromosómicas AmpC, en las que las mutantes desreprimidas enmascaran la presencia de BLEE, complicando su detección.

De los 36 aislados estudiados el 3% (1/36) presentó un fenotipo de resistencia compatible a AmpC inducible, este tipo de betalactamasa puede ocasionar fracasos terapéuticos descritos en infecciones causadas por aislados hiperproductores de AmpC inducible en tratamientos con betalactámicos (Ferran, 2011).

El 42% (15/36) de los aislados del estudio presentó resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacina, evidenciando así una posible mutación en gyrA, esto se corrobora en diversos trabajos en los cuales la presencia de una mutación en gyrA es suficiente para desarrollar resistencia frente a ácido nalidíxico, dicha mutación se da en el codón 87 de gyrA, sin que se hayan detectado mutaciones en parC, lo cual produce un descenso en la susceptibilidad a fluoroquinolonas, siendo necesario más mutaciones adicionales en gyrA, gyrB y/o parC para que la generación de resistencia frente a fluoroquinolonas. (Miró *et al*., 2004; Ruiz *et al.*, 2004)

Estudios iniciales en *Escherichia coli* demostraron que la resistencia a las quinolonas se produce naturalmente por mutaciones en regiones definidas de las proteínas gyrA y en menor medida en gyrB (Yoshida *et al*., 1991), además se determinó que mutaciones en las regiones equivalentes de las proteínas ParC o ParE (topoisomerasa IV) producían resistencia a quinolonas (Heisig, 1996). Se ha descrito que una sola mutación no da como resultado una resistencia clínicamente relevante sin embargo una combinación de mutaciones que afecte a los genes gyrA o gyrB y parC o parE que codifican para las subunidades A y B de topoisomerasas II y IV respectivamente genera presencia de estos mecanismos de resistencia mediada por genes, lo cual fue compatible con el 14% (5/36) de resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad intermedia a ciprofloxacino que se presentó en el estudio, evidenciando la posibilidad de al menos dos mutaciones en gyrA o gyrA+parC (Talens, 2002).

Además el 33% (12/36) presentó resistencia al ácido nalidíxico y ciprofloxacino lo cual sugiere una alta probabilidad la presencia de genes qnr. Estudios realizados por Rodríguez *et al*., (2011), observaron que las proteínas qnr facilitan la selección de mutantes resistentes a quinolonas de alto nivel, en este contexto estudios previos in vivo han demostrado que la presencia de genes qnr en asociación con mecanismos adicionales de resistencia a quinolonas suele ser relevante para la actividad in vivo de estos agentes antimicrobianos.

En la detección fenotípica de los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos se utilizó amikacina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina y tobramicina; Martinez y Ruiz (2009) detallan los fenotipos de implicados en los mecanismos de resistencia asociados a enzimas modificantes de aminoglucósidos, muchos de los cuales se encontraron en este estudio, de los 36 aislados estudiados

presentaron un patrón de resistencia de 39% (14/36) para la enzima AAC (6'), 28% (10/36) para la enzima ANT (2"), 11% (4/36) para la enzima AAC (3) IV, en tanto que un 3% (1/36) presentó un patrón clásico sin resistencia adquirida, un 6% (2/36) presentaron resistencia a todos los antibióticos (Impermeabilidad) y el 14% (5/36) no presentó compatibilidad con ninguno de los patrones preestablecidos. Se conocen tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos: O-fosfotransferasas [APHs, genes aphA, strA, strB], N-acetiltransferasas [ACCs, genes aac (3"), aac (6")], y O-adeniltransferasas [ANTs, genes aadA, aadB o también denominados como ANT (Michael *et al*., 2006; van Hoek *et al*., 2011). La eficacia de los aminoglucósidos se ve disminuida notablemente por el surgimiento las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) presentes en prácticamente en casi todos los géneros bacterianos (Ramirez y Tolmasky, 2010).

El 86% de los aislados presentaron fenotipo de multidrogo resistencia el cual se presenta a tres o más familias de antibióticos, a los que habitualmente son sensibles, estas incluyen betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos (Palomar *et al*., 2008). La Organización Mundial de Salud (OMS), Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), reconocen la propagación de bacterias multidrogo resistentes como una grave problemática en la salud humana y animal. Siendo el desarrollo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos un fenómeno muy recurrente. Debido a la gran frecuencia con la que ocurren los mecanismos de resistencia y transferencia de genes entre muchas bacterias patógenas e incluso en los microorganismos comensales, los cuales solo incrementan esta problemática (OIE, 2008).

En el Perú, la vigilancia de resistencia se realiza de manera *in vitro* mediante métodos fenotípicos, donde se determina la sensibilidad o resistencia antibiótica, con lo cual esta investigación tiene como finalidad dar a conocer por métodos fenotípicos los mecanismos de resistencia implicados en la resistencia a antibióticos de la *Escherichia coli.*

VI. CONCLUSIONES

1. El 3% (1/36) evidenció la presencia de betalactamasa de tipo AmpC.
2. El 42% (15/36) evidenció una posible mutación en gyrA, el 14% (5/36) al menos dos posibles mutaciones en gyrA o gyrA+parC, además el 33% (12/36) presentó altas probabilidades de genes qnr.
3. Las enzimas del mecanismo de resistencia a aminoglucósidos expresadas fueron de 39% (14/36) para AAC (6'), 28% (10/36) para ANT (2") y 11% (4/36) a AAC (3) IV en aislados de *Escherichia coli*.

V. LITERATURA CITADA

Abraham E y Chain E. 1988. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of Infectious Diseases*, *10*(4): 677-678.

Ambler RP.1980. The structure of beta-lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 289(1036): 321-331.

Anne Michael, Dominey-Howes, Labbate. 2014. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. *Frontiers in Public Health*, *2*.

Antibiotic resistance: Origins, evolution, selection and spread. Ciba Foundation Symposium 207. (1999). *Journal of Biomedical Materials Research*, *48*(1): 94-94.

Arêde P, Milheiriço C, Lencastre H. de, Oliveira DC. 2012. The Anti-Repressor MecR2 Promotes the Proteolysis of the mecA Repressor and Enables Optimal Expression of β-lactam Resistance in MRSA. *PLOS Pathogens*, *8*(7): e1002816.

Belland R, Morrison S, Ison C, Huang W. 1994. Neisseria gonorrhoeae acquires mutations in analogous regions of gyrA and parC in fluoroquinolone-resistant isolates. *Molecular Microbiology*, *14*(2): 371-380.

Bessone G, Bessone F, Marini, Conde B, Piscitelli H, Zielinski . 2015. VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur. E.E.A. INTA. Córdoba Argentina.

Bettelheim K, Breadon A, Faiers M, O´ Farrell S, Shooter RA.1974. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. Epidemiology and Infection, 72(1): 67-70.

Bischoff K, White D, McDermott P, Zhao S, Gaines S, Maurer J, Nisbet D. 2002. Characterization of chloramphenicol resistance in betahemolytic *Escherichia coli* associated with diarrea in neonatal swine. J. Clin Microbiol; 40(2): 389394.

Blair J, Webber M, Baylay A, Ogbolu D,Piddock, L. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1): 42-51.

Blanco P, Hernando-Amado, Reales-Calderon., Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, Martinez J. 2016. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, *4*(1).

Blondeau J M. 2004. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*, *49 Suppl 2*: S73-78.

Bradford. 2001. Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(4): 933-951.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(6): 1211-1233.

Bush Karen. 2013. Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1277*: 84-90.

Bush Karen. 2013. The ABCD's of β-lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, *19*(4): 549-559.

Bush K y Jacoby G. 2010. Updated Functional Classification of β-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(3): 969-976.

Butaye P, Devriese L, Haesebrouck F. 2003. Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(2): 175-188.

Castellani A y Chalmers A.1919. Manual of Tropical Medicine. [Internet], [21 de agosto del 2017]. Disponible en: http://www.westerdijkinstitute.nl/Collections/BiolomICSaspx?zTableKey=14682616000000061&Rec=4203&Fields=All

Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *65*(2): 232-260.

Ciorba V, Odone A, Veronesi L., Pasquarella C, Signorelli C. 2015. Antibiotic resistance as a major public health concern: epidemiology and economic impact. *Annali Di Igiene: Medicina Preventiva E Di Comunita*, *27*(3): 562-579.

Cona E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Rev Chil Infect. 19 (Supl. 2): S 77-81

Connell SR., Tracz DM, Nierhaus K, Taylor DE. 2003. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(12): 3675-3681.

Cui S, Ge B, Zheng J, Meng J. 2005. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Campylobacter spp. and Salmonella Serovars in Organic Chickens from Maryland Retail Stores. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(7): 4108-4111.

Davis B. 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological Reviews*, *51*(3): 341-350.

D'Costa VM., King CE., Kalan L, Morar M., Sung W, Schwarz C, Wright GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365): 457-461.

de Toro, Seral, Rojo-Bezares, Torres, Castillo, Sáenz. 2014. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de Salmonella enterica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32*(1): 4-10.

Delcour AH, 2009. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochimica et biophysica acta*, *1794*(5): 808-816.

Di Conza, Badaracco, Ayala, Rodriguez, Famiglietti, Gutkind. 2014. β-lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant enterobacteria isolated in Buenos Aires, Argentina: A new blaTEM gene. *Revista Argentina de Microbiología*, *46*(3): 210-217.

Diaz Granados CA, Zimmer SM, Klein M, Jernigan JA. 2005. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *41*(3): 327-333.

Dodgson C, Amor P, Whitfield C. 1996. Distribution of the rol gene encoding the regulator of lipopolysaccharide O-chain length in *Escherichia coli* and its influence on the expression of group I capsular K antigens. *Journal of Bacteriology*, *178*(7): 1895-1902.

Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, del Carmen Conejo M, Pascual Á, Tomás JM., Benedí VJ. 2003. Role of Klebsiella pneumoniae OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(10): 3332-3335.

Dönhöfer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson D. 2012. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, *109*(42): 16900-16905.

Escherich, T. (1885). The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. *Reviews of Infectious Diseases*, *11*(2): 352-356.

Espeli Marians. 2004. Untangling intracellular DNA topology. *Molecular Microbiology*, *52*(4): 925-931. [Internet], disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04047.x

Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, Soloaga R. 2005. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. *Revista argentina de microbiología*, *37*(1): 57-66.

Fariñas MC, Martínez-Martínez L. 2013. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 402-409.

Farmer JJ III. 1995. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: Manual of clinical microbiology. 6ª ed . Washington, D.C. ASM Press1995: 440.

Faron ML, Ledeboer NA, Buchan BW. 2016. Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(10): 2436-2447.

Ferran Navarro, Jorge Calvo, Rafael Cantón, Felipe Fernandez-Cuenca y Beatriz Mirelis. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gram-negativos. Enferm Infecc Microbiol Clin, 29:524-34

Gardete y Tomasz. 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(7): 2836-2840.

Garofalo C, Vignaroli C, Zandri G, Aquilanti L, Bordoni D, Osimani A, Biavasco F. 2007. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *International Journal of Food Microbiology*, *113*(1): 75-83.

Garrity, Bell, Lilburn. 2004. *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Release 5.0 Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. 2nd edition. Springer.

Garrity, Berner, Creig, Staley. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.2nd edition .Vol 2 Part B. Springer. p 607-620

Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *47*(3): 137-146.

Gillings M. 2014. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *78*(2): 257-277.

Gundogan N, Citak S, Yucel N, Devren A. 2005. A note on the incidence and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from meat and chicken samples. *Meat Science*, *69*(4): 807-810.

Hancock RE. 1981. Aminoglycoside uptake and mode of action--with special reference to streptomycin and gentamicin. I. Antagonists and mutants. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *8*(4): 249-276.

Hancock y Brinkman. 2002. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annual Review of Microbiology*, *56*: 17-38.

Harada K, Asai T, Kojima A, Sameshima T, Takahashi T. 2007. Contribution of multiantimicrobial resistance to the population of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from apparently healthy pigs in Japan.Microbiol Immunol; 51:493–499

Hasdemir UO, Chevalier J, Nordmann P, Pagès JM. 2004. Detection and Prevalence of Active Drug Efflux Mechanism in Various Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae Strains from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(6): 2701-2706. https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2701-2706.2004

Heesemann J. 1993. [Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics]. *Infection*, *21 Suppl 1*: S4-9.

Heisig P. 1996. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *40*(4): 879-885.

Helmuth, R. y Hensel, A. 2004. Towards the rational use of antibiotics: results of the first international symposium on the risk analysis of antibiotic resistance. J. Vet. Med; B 51: 357360.

Herendeen S,VanBogelen, Neidhardt. 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. J. Bacteriol. 139: 185–194.

Hollenbeck BL., Rice LB 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, *3*(5): 421-569.

Höltje J. 1998. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(1): 181-203.

Hooper DC. 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *The Lancet. Infectious Diseases*, *2*(9): 530-538.

Ingraham JL, Marr AG. 1996. Effect of temperature,pressure,pH, and osmotic stress on growth. In Neidhardt, Curtiss, Ingraham, Lin, Low, Magasanik, Reznikoff, Riley, Schaecter, Umbarger. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd Ed., Vol. 2, ASM Press, Washington D.C. pp. 1570–1578.

Ito H, Yoshida H, Bogaki-Shonai M ,Niga T, Hattori H, Nakamura, S. 1994. Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase gyrA and gyrB genes of Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *38*(9): 2014-2023.

Jacoby GA. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *41 Suppl 2* : S120-126.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, *10*(4): 867-878.

Jindal A, Pandya K, Khan I. 2015. Antimicrobial resistance: A public health challenge. Medical Journal, Armed Forces India, 71(2): 178-181.

Josephine H, Kumar I, Pratt RF. 2004. The perfect penicillin? Inhibition of a bacterial DD-peptidase by peptidoglycan-mimetic beta-lactams. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(26): 8122-8123

Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C. 2005. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews*, *105*(2): 425-448.

Katz L y Ashley G. 2005. Translation and protein synthesis: macrolides. *Chemical Reviews*, *105*(2): 499-528.

Kikuvi SK, Lee HS, Nam HM, Cho YS, Kim JM, Song SW, Park YH, Jung SC. 2007. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from

fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003–2004. Int J Food Microbiol; 116:283–286.

Knapp CW, Dolfing J, Ehlert P, Graham DW. 2010. Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. *Environmental Science & Technology*, *44*(2): 580-587.

Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. *Infection*, *11*(6): 315-317.

Koch A. 2000. Penicillin binding proteins, beta-lactams, and lactamases: offensives, attacks, and defensive countermeasures. *Critical Reviews in Microbiology*, *26*(4): 205-220.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*, *8*(6): 423-435.

Kong K, Schneper L, Mathee K. 2010. Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, *118*(1): 1-36.

Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. 2000. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(12): 3249-3256.

Lahey Clinic. 2015. ß-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. [Internet], [21 de agosto del 2017]. Disponible en: https://www.lahey.org/Studies/

Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *34*(4): 482-492.

Li W, Atkinson GC, Thakor NS, Allas Ü, Lu C, Chan KY, Frank J. 2013. Mechanism of Tetracycline Resistance by Ribosomal Protection Protein Tet(O). *Nature communications*, *4*, 1477.

Livermore D. 2008. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 14 (1): 3-10.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. The Role of Topoisomerases in DNA Replication. Recuperado a partir de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21703/

López-Álvarez. 2010. *Escherichia coli*: Mecanismos de patogenicidad. Departamento de bacteriología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 29p.

Manning D . 2010. *Escherichia Coli Infections*. 2nd Edition. Chelsea House. p 16-37

Martínez Martínez L, Calvo J. 2010. El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. Enferm Infecc Microbiol Clin. 28:2531.

Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby G .1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet (London, England)*, *351*(9105): 797-799.

Martinez-Martinez L, Ruiz de Alegria C. 2009. *Escherichia coli* resistente a gentamicina y sensible a amikacina. En atlas del antibiograma, pp. 141-143. Editado por J. l. Alós, R. Cantón, L. Martinez- Martinez y J. Vila: Biomérieux University

Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C,Aubry A. 2012. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis and a proposed gyrase numbering system. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(4): 819-831.

McEwen S y Fedorka-Cray. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *34 (3):* S93-S106.

McMurry L, Petrucci R, Levy S. 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(7): 3974-3977.

Medeiros A. 1997. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *24 Suppl 1*: S19-45.

Menninger J, Otto D. 1982. Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *21*(5): 811-818.

Michael, Gillings M, Holmes A, Hughes L, Andrew N, Holley M, Stokes H. 2004. Mobile gene cassettes: a fundamental resource for bacterial evolution. *The American Naturalist*, *164*(1):1-12.

Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa R, Navarro F, Coll P. 2006. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β-lactamases in *Escherichia coli. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *24*(6):370-372.

Miró E, Vergés C, García I, Mirelis B, Navarro F, Coll P, Prats G, Martínez-Martínez L. *2004.* Resistencia a *quinolonas* y betalactámicos en Salmonella entérica, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa. Enferm Infecc Microbiol Clin;22(4):204-11 205.

Moellering R, 2011. Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *37*(1): 2-9.

Moredo F, Vigo G, Cappuccio J, Piñeyro P, Perfumo C. J., Giacoboni, G. I. 2007. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. *Revista argentina de microbiología*, *39*(4): 227-229.

Morote E. 2015. Prevalencia de *E. Coli* BLEE en pacientes mujeres del Hospital Nacional PNP-"LNS". [Internet], [10 de noviembre del 2017]. Disponible en: http://cybertesis.urp.edu.pe/bitstream /urp/565/1/Morote_e.pdf

Mukhtar T, Wright G. 2005. Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. *Chemical Reviews*, *105*(2): 529-542.

Munita J, Arias C. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2). [Internet], [16 de julio del 2017]. Disponible en:https://doi.org/10.1128 /microbiolspec.VMBF-0016-2015

Nataro P y Kaper J .1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(1): 142-201.

Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca, Mirelis B. 2008. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 524-534.

Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *67*(4): 593-656.

Nitiss J. 2009. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature reviews. Cancer*, *9*(5): 327-337.

Novartis. 2007. Asociación Argentina Cabañeros de Porcinos: Diarrea Neonatal por *Escherichia coli*. [Internet], [15 de junio del 2017]. Disponible: en: http://www.infogranjas.com.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=473%3Adiarrea-neonatal-por-escherichia-coli&catid=383%3Aporcinos-sanidad&Itemid=306

OIE. 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres métodos de laboratorio para los ensayos de sensibilidad de las bacterias frente a los antimicrobianos.

OIE.2016. Boletín: Manejo adecuado de los antibióticos. [Internet], [10 de setiembre del 2016]. Disponible en: http://www.oie.int/ fileadmin/Home/eng/Publications_%26_ Documentation/docs/pdf/bulletin/Bull_2016-3-ESP.pdf

Ola Sköld. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, *3*(3), 155-160.

Oliver A, Cantón R. 2003. Enterobacterias productoras de betalactamasas plasmídicas de espectro extendido. [Internet], [10 de noviembre del 2017]. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Blees.htm.

OMS. 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud, Genebra 27, Suiza. Pag 16.

OPS. Detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en el laboratorio. [Internet], [05 de noviembre del 2017]. Disponible en: http://www.paho.org /pahousaid/dmdocuments/GRT_Deteccion_Mecanismos_Resistencia_Antimicrobianos_Laboratorio.pdf?ua=1

Oteo J, Campos J, Lázaro E, Cuevas O, García-Cobos, Pérez-Vázquez, Spanish Members of EARSS. 2008. Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(8): 1259-1262.

Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. 2015. Classification of Beta-Lactamases and Penicillin Binding Proteins Using Ligand-Centric Network Models. [Internet], [20 de octubre del 2016]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/ PMC4331424/

Pagès J, James C, Winterhalter M. 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, *6*(12): 893-903.

Pai H, Kang C, Byeon J, Lee K, Park W, Kim H, Choe K. 2004. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC type beta lactamase producing Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(10): 3720-3728.

Palomar M, Álvarez-Lerma F, Olaechea P, Insausti J, López-Pueyo MJ. 2008. Informe ENVIN. [Internet], [15 de noviembre del 2017]. Disponible en::http://hws.vhebron.net/envin-helics/Help/ENVIN-UCI Informe 2008.pdf

Pape T, Wintermeyer W, Rodnina M. 2000. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature Structural Biology*, *7*(2): 104-107

Park Y. 2009. Aminoglycoside Resistance in Gram-negative Bacilli. *Korean Journal of Clinical Microbiology*, *12*(2), 57.

Parveen S, Taabodi M, Schwarz J, Oscar T, Harter-Dennis J, White D. 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella recovered from processed poultry. *Journal of Food Protection*, *70*(11): 2466-2472.

Patel U, Yan Y, Hobbs F, Kaczmarczyk J, Slee A, Pompliano D, Bobkova E. 2001. Oxazolidinones mechanism of action: inhibition of the first peptide bond formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(40): 37199-37205.

Paterson D, Bonomo R. A. 2005. Extended Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(4): 657-686.

Pearce y Roberts. 1995. Cloning and analysis of gene clusters for production of the *Escherichia coli* K10 and K54 antigens: Identification of anew group of ser A-linked capsule gene clusters.J.Bacteriol. 177: 3992–3997

Petrosino, Pendleton, Weiner, Rosenberg. 2002. Chromosomal system for studying AmpC-mediated β-lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 46**:**1535-1539.

Phillip David. 2010. *Escherichia coli* or *E. coli* | Visuals Unlimited. [Internet], [20 de setiembre del 2016]. Disponible en: https://visualsunlimited.photoshelter.com/image/ I0000NYUH6ez9o5g

Piddock LJ. 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(2): 382-402.

Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(1): 20-51.

Prescott JF. 2000. Antimicrobial drugresistance and its epidemiology. En: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Iowa, Iowa State University Press. Pag. 2749.

Quinn J, Dudek E, DiVincenzo C, Lucks D, Lerner S. 1986. Emergence of resistance to imipenem during therapy for Pseudomonas aeruginosa infections. *The Journal of Infectious Diseases*, *154*(2): 289-294.

Ramirez M, Tolmasky M. 2010. Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, *13*(6): 151-171.

Roberts M. 2008. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, *282*(2): 147-159.

Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C., Martínez-Martínez L., Pascual, A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, *17*(2): 149-182.

Rojas M, Valle D. 2009. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, *29*(2). [Internet], [10 de julio del 2017]. Disponible en: http://www.redalyc.org/resumen.oa ?id=199414957003

Rubinstein E. 2001. History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy*, *47 Suppl 3*, 3-8; discussion 44-48. [Internet], [22 de octubre del 2016]. Disponible en: https://doi.org/10.1159/000057838

Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(5): 1109-1117.

Ruiz J, Navia M, Marco F, Vila J. 2004. Mecanismos de resistencia a betalactámicos y ácido nalidíxico en aislados clínicos de Salmonella enterica serotipo hadar y bsilla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. p 252-253.

Schmidtke AJ , Hanson N D. 2006. Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(6): 2030-2037.

Schulz GE. 2002. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1565*(2): 308-317.

Seral C, Pardos M, Castillo F. 2010. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella. Enferm Infecc Microbiol Clin. 28(Supl 1):12-18

Shaw, Marr, Ingraham. 1971. Determination of the minimal temperature for growth of *Escherichia coli.* J. Bacteriol. 105: 683–684

Sköld, O. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, *32*(3-4): 261-273.

Smith R, Keogh-Brown M, Barnett T. 2011. Estimating the economic impact of pandemic influenza: An application of the computable general equilibrium model to the U.K. *Social Science & Medicine (1982)*, *73*(2): 235-244.

Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*(3): 382-403.

Stine OC, Johnson JA, Keefer NA, Perry KL, Tigno J, Qaiyumi S, Stine MS, Morris JG. 2007. Widespread distribution of tetracycline resistance genes in a confined animal feeding facility. Int J Antimicrob Agents. 29:348–352

Sun J, Deng Z, Yan A.2014. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *453*(2): 254-267

Talens-Visconti, Garrigues, Cantón. 2002. Quinolonas y Streptococcus pneumoniae, Mecanismo de acción y resistencia. [Internet], [21 de agosto del 2016] Disponible en: http://www.seq.es/seq/0214-3429/15/4/313.pdf

Trilla A, Trilla G, Daer C. 2008. The 1918 "Spanish flu" in Spain. Clin Infect Dis. 1;47(5):668-73.

Typas A, Banzhaf M, Gross C, Vollmer W. 2011. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature reviews. Microbiology*, *10*(2): 123-136.

Vakili B, Khorvash F, Fazeli H, Khaleghi M. 2014. Detection of quinolone-resistance mutations of parC gene in clinical isolates of Acinetobacter baumannii in Iran. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, *19*(6): 567-570.

Van den Bogaard A, Driessen C, London N, Stobberingh E. 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. J. Antimicrob. Chemother. 45:663671

Vannuffel P, Cocito C. 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, *51 Suppl 1*: 20-30.

Vila J, Marco F. 2010. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 726-736.

Webber M, Piddock L. 2001. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Veterinary Research*, *32*(3-4): 275-284.

Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(3): 577-585.

WHO.2017. Antimicrobial resistance. [Internet], [21 de noviembre del 2017]. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/

WHO. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. [Internet], [21 de agosto del 2016]. Disponible en: http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/

Wilson D. 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, *12*(1): 35-48.

Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka L, Nakamura S. 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *35*(8): 1647-1650.

Zemelman R, Valenzuela L, Domínguez M, Bello H, González G, Zemelman C. 2002. Detección de ß-lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de microbiología. [Internet], [03 de marzo del 2017]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php ?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019200005

Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz K J, Stevenson GW. 2012. Diseases of swine. 10a ed. Iowa: Wiley – Blackwell. 1012p.