



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Evaluación fenotípica y genotípica de la resistencia a
tetraciclina en cepas de *Escherichia coli* de origen animal**

Autor: MV. Florencia Laura Pantozzi

Director Honorario Póstumo: Dr. Germán Blas Vigo

Director: Dr. Guillermo Hernán Sguazza

Lugares de realización:

**Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas (LADIB)
Laboratorio de Virología (LAVIR) - Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata**

Miembros del jurado:
**Dra. Graciela Carloni
Dra. Mercedes Lojo
Dra. Nora Mestorino**

2018

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a,

Mis padres, Nené y Carlitos

En especial a mi madre, que me inculcó el amor a la bacteriología

A mi querida hermana, Flavia

A mis adorados sobrinos, Rocío y Felipe

A mi amado José

A todos los que me quieren y confían en mí

A mí

"La evolución de las bacterias hacia la resistencia a los antimicrobianos es inevitable, ya que representa un aspecto particular de la evolución general. Así, en el mejor de los casos, la única esperanza que podemos tener en el ámbito de la resistencia antimicrobiana es demorar la diseminación de bacterias resistentes o genes de resistencia"

Patrice Courvalin

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Al Dr. Germán BlasVigo, que me impulsó a realizar la carrera de doctorado ofreciéndose a dirigirme y por todos los buenos momentos compartidos a lo largo de veinte años.

Al Dr. Hernán Sguazza por su don de gente, por aceptarme incondicionalmente en la dirección de este trabajo, por el placer que significa trabajar a su lado y por ser, a mi juicio, el mejor director que podría haber tenido.

A mis compañeros del LADIB, Dr. Germán Vigo, Dra. Fabiana Moredo, Dra. Gabriela Giacoboni, a los Sres. Fabio Nieves y Walter Nieves, por todos los años de vida compartidos, en las buenas y en las malas, y por haber iniciado juntos el estudio de la resistencia antimicrobiana en bacterias animales incluidas en esta tesis.

A las médicas veterinarias María Laura Casaux y Mariana Buffoni Almeida, mis queridas becarias, que durante dos años trabajamos codo a codo realizando el arduo trabajo de aislamiento y caracterización de la mayoría de las cepas incluidas.

A la Dra. Mariela Ibar, por compartir cada día desde hace más de diez años, nuestras vidas y nuestro trabajo.

Al Sr. Hernán Porro, secretario del Servicio de Diagnóstico e Bacteriológico y Antimicrobianos, por su disponibilidad constante.

A mi querida Iris Olmedo, siempre presente con sus consejos y su risa contagiosa.

Al personal del LAVIR, donde desarrollé la parte molecular de esta tesis, que me recibieron siempre con amabilidad y una sonrisa y dispuestos a ayudarme en todo momento, haciendo sumamente agradable el tiempo compartido.

Al Dr. Leandro Picotto, que colaboró en las extracciones de ADN haciendo la tarea más amena.

Un agradecimiento especial a mi gran Profesor José María Casellas, quien me enseñó y me hizo amar los antimicrobianos y el arte de las bacterias para evadirlos, por haberme iniciado en la investigación y por haber creído siempre en mí dándome la confianza necesaria para poder desarrollarme en esta tarea.

A mi gran amigo y profesor médico veterinario Alberto Dibbern, por sus consejos, su confianza en mí y por haberme dado la posibilidad de formar parte del LADIB.

Sin todos ellos, esta tesis doctoral no hubiera sido posible.

Muchas gracias a todos, siempre los llevaré en mi corazón.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

Pantozzi FL, Ibar MP, Nievas VF, Vigo GB, Moredo FA, Giacoboni GI. Wild-type minimal inhibitory concentration distributions in bacteria of animal origin in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2014; 46(1):34-40.

Pantozzi FL, Picotto L, Sguazza GH. Detección de los principales genes de resistencia a tetraciclina en *Escherichia coli*. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología XIV Congreso Argentino de Microbiología. Rosario, Argentina. Setiembre 2016.

INDICE

PORTADA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE PUBLICACIONES PARCIALES DEL	
TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.....	VI
INDICE.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	XIII
INDICE DE FIGURAS.....	XIV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XV
RESUMEN.....	XX
ABSTRACT.....	XXII
1.-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- ANTIBIÓTICOS Y ANTIMICROBIANOS.....	1
1.1.1 - El descubrimiento de los antibióticos. Un hito histórico.....	1
1.1.2.- Estrategias de uso y consumo de los ATM en Veterinaria.....	4

1.2.- TETRACICLINAS.....	7
1.2.1.- Estructura química y clasificación.....	7
1.2.2- Farmacocinética.....	9
1.2.3.- Mecanismo de acción.....	10
1.3.- RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	11
1.3.1- Origen de los genes de resistencia. El resistoma antibiótico.....	11
1.3.2.- Efectos de los Antimicrobianos en la Microbiota Intestinal.	
Transferencia de genes de Resistencia Antimicrobiana.....	15
1.3.3.- Mecanismos de resistencia a Tetraciclina.....	17
1.4.- <i>ESCHERICHIA COLI</i>.....	22
1.4.1.- Clasificación taxonómica.....	22
1.4.2.- Sensibilidad antimicrobiana.....	23
1.4.3. - Multiresistencia antimicrobiana en <i>Escherichia coli</i> comensal.....	23
1.4.4.- Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	24
1.5.- SITUACION EN NUESTRO PAIS.....	26
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27

2.1.- Hipótesis.....	27
2.2.- Objetivo general.....	27
2.2.1- Objetivos particulares.....	28
3.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1.- CEPAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.....	29
3.1.1.-Muestreo.....	29
3.1.2.-Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	29
3.1.3.-Determinacion fenotípica de sensibilidad a tetraciclina.....	30
3.2.- ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	30
3.2.1.- Diseño de <i>primers</i> utilizados en el estudio genotípico.....	30
3.2.2.- Método de extracción del ADN.....	31
3.2.2.1- Lisis celular por ebullición.....	31
3.2.2.2- Extracción con DNazol.....	32
3.2.2.3- Extracción con kit comercial.....	33
3.2.3.- PCR simple.....	34
3.2.4.- Optimización de la concentración de <i>primers</i>	35

3.2.5.- Optimización de las condiciones de <i>annealing</i>	35
3.2.6.- Optimización del número de ciclos.....	36
3.2.7.- PCR múltiple.....	37
3.3.- ANÁLISIS GENÉTICO DE MUESTRAS DE CAMPO.....	37
3.3.1.- Determinación genotípica de la resistencia a tetraciclina.....	38
3.3.2.- Determinación de la presencia de marcadores de resistencia en plásmidos.....	38
3.4.- OBTENCIÓN DE BACTERIAS QUÍMICAMENTE COMPETENTES.....	40
3.4.1.- Transformación.....	41
4.-RESULTADOS.....	43
4.1.- CEPAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.....	43
4.1.1.-Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	43
4.1.2.- Determinación fenotípica de sensibilidad a tetraciclina.....	43
4.2.- ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	44
4.2.1.- Diseño de <i>primers</i> utilizados en el estudio genotípico.....	44
4.2.2.- Método de extracción del ADN molde.....	45

4.2.3.- PCR simple.....	47
4.2.4.- Optimización de la concentración de <i>primers</i>	48
4.2.5.- Optimización de la temperatura de <i>annealing</i>	49
4.2.6.- Optimización del número de ciclos.....	50
4.2.7.- PCR múltiple.....	51
4.3.- ANÁLISIS GENÉTICO DE MUESTRAS DE CAMPO.....	52
4.3.1.- Determinación genotípica de la resistencia a tetraciclina.....	52
4.3.2.- Determinación de la presencia de marcadores de resistencia en plásmidos.....	55
5.-DISCUSIÓN.....	58
5.1- RESISTENCIA FENOTÍPICA.....	58
5.1.1- Resistencia fenotípica en pollos parrilleros.....	58
5.1.2- Resistencia fenotípica en porcinos.....	59
5.1.3- Resistencia fenotípica en bovinos.....	60
5.2- RESISTENCIA GENOTÍPICA.....	61
5.2.1- Resistencia genotípica en pollos parrilleros.....	61
5.2.2- Resistencia genotípica en porcinos.....	63

5.2.3- Resistencia genotípica en bovinos.....	64
5.3- SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA FENOTÍPICA Y GENES DE RESISTENCIA ASOCIADOS.....	65
5.4.- MARCADORES DE RESISTENCIA EN PLÁSMIDOS.....	66
6.-CONCLUSIONES.....	69
7- BIBLIOGRAFÍA.....	71
8.- ANEXOS.....	90
8.1- ANEXO I.....	90
8.2- ANEXO II.....	94

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Miembros principales de tetraciclinas

Tabla 2: Mecanismos de Resistencia para los genes *tet* y *otr*

Tabla 3: Genes de Resistencia en bacterias ambientales

Tabla 4: Parámetros de ciclado

Tabla 5: Distribución de CIM y ECOFF, ECV ó WCV de *Escherichia coli* incluidas en el estudio para identificar los genes asociados a la resistencia

Tabla 6: Distribución de CIM's y ECOFF, ECV ó WCV de *Escherichia coli* aisladas de aves, porcinos y bovinos en los periodos 2006-2008 y 2010-2012

Tabla 7: Diseño de *primers* en el estudio genotípico

Tabla 8: Comparación de los métodos de extracción del ADN molde

Tabla 9: Frecuencia de los genes de resistencia a TET en *Escherichia coli* por especie animal y por periodo

Tabla 10: Frecuencia de la combinación de los genes de resistencia a TET en *Escherichia coli* por especie animal y por periodo

Tabla 11: Frecuencia de la presencia de plásmidos y de genes de resistencia a TET en *Escherichia coli* por especie animal y por periodo

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Años de introducción y de desarrollo de resistencia antimicrobiana de las distintas familias de compuestos de importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas

Figura 2: Estructura química de la tetraciclina

Figura 3: El resistoma antibiótico y los distintos ámbitos implicados en el mismo

Figura 4: ADN genómico obtenido a partir de una misma cepa de *Escherichia coli*, por tres métodos distintos: (1) DNAzol, (2) Lisis por ebullición y (3) kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit.

Figura 5: Amplificación por PCR simple de los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM* y *rna16S*.

Figura 6: Amplificación de cada uno de los genes con distintas concentraciones de *primers*

Figura 7: Amplificación de cada uno de los genes con distintas temperaturas de annealing

Figura 8: Amplificación en tiempo real de cada uno de los genes. Cuantificado como Unidades Relativas de fluorescencia (URF) en función del número de ciclos.

Figura 9: Amplificación por mPCR de cada uno de los genes de resistencia a tetraciclina.

Figura 10: Ejemplo de algunas corridas de la amplificación por mPCR de los aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a tetraciclina.

Figura 11: Ejemplo de la corrida electroforética y la visualización de plásmidos en geles de agarosa.

Figura 12: mPCR de las bacterias transformadas que adquirieron resistencia a tetraciclina.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Abs: Absorbancia

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APC: Agentes promotores de crecimiento

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ATB: Antibióticos

ATCC: American Type Culture Collection

ATM: Antimicrobianos

ATS: Agar Tripticasa Soya

BLASTn: Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

DANMAP: Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme

dNTPs: Trifosfatos de Deoxiribonucleótido

ECOFF: Epidemiological Cutoff

ECV: Epidemiological Cutoff Value

EDTA: Ácido etilendiaminoteraacético

EE: Explotación extensiva

EF-G: Factor de elongación ribosomal

EF-Tu: Factor de elongación ribosomal

EI: Explotación intensiva

EM: Estados miembros

EMB: Agar Eosina Azul de Metileno

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA: Food and Drug Administration

GTP: Trifosfato de guanosina

GTPasas: Trifosfatasas de guanosina

kDa: kilodalton

LB: Luria Bertani

M: molar

MDR: Resistencia a Múltiples Drogas

MFS: Superfamilia facilitadora principal

mg/ml: miligramo por mililitro

mPCR: Multiplex Polymerase Chain Reaction

n: Tamaño de la muestra

NADP: Dinucleótido Fosfato Oxidado de Nicotinamida Adenina

NADPH: Dinucleótido Fosfato Reducido de Nicotinamida Adenina

ng: nanogramos

nm: nanómetro

NWT: Población Non Wild Type

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de bases

PCR: Reacción de Amplificación, "*Polymerase Chain Reaction*"

mPCR: Reacción de amplificación múltiple

qPCR: Reacción de amplificación en tiempo real

RAM: Resistencia antimicrobiana

rna16S: Gen ribosomal 16S

RNasa: Ribonucleasa

TBE: Tris Borato EDTA

tet: genes de resistencia a tetraciclina

tet / otr: genes de resistencia a tetraciclina

Tet: proteínas de tetraciclina

TET: Tetraciclina

TI: Tracto intestinal

ug/ml: microgramo por mililitro

μl: microlitros

μM: micromolar

V: Voltios

WCV: Wild Type Cutoff Values

WT: Población Wild Type

β: Beta

%: Porcentaje

+: Positivo

°C: Grados Celsius

≥: Mayor o igual que

x: Por

h: Hora

min: Minutos

RESUMEN

Evaluación fenotípica y genotípica de la resistencia a tetraciclina en cepas de *Escherichia coli* de origen animal

Durante el tratamiento con antimicrobianos, todas las bacterias del organismo están expuestas a una presión selectiva, especialmente en el tracto intestinal, y los genes seleccionados de esta manera pueden ser transferidos horizontalmente. *Escherichia coli*, en especial, posee una tendencia a desarrollar nuevas resistencias a los antimicrobianos con el fin de sobrevivir y además puede actuar como reservorio para estos genes. Esto da como resultado la selección natural de cepas resistentes, portadoras de un importante conjunto de genes, con la capacidad de transmitirlos a otras cepas bacterianas presentes en el intestino humano o animal. Basado en esto, el objetivo de este trabajo de tesis, fue analizar la presencia de diferentes genes de resistencia a tetraciclina, los más comúnmente hallados en *Escherichia coli* de origen animal, *tetA*, *tetB* y *tetC*, involucrados en el mecanismo de eflujo de salida y el gen *tetM*, implicado en la protección ribosomal, y contribuir a esclarecer el rol de *Escherichia coli* en la transmisión de dichos genes de resistencia. Para ello se estudiaron un total de 454 cepas de *Escherichia coli* aisladas a partir de materia fecal de pollos parrilleros, porcinos y bovinos de terminación sin signología clínica, entre los años 2006-2008 y 2010-2012; de las cuales 281 cepas (61.9%), mostraron sensibilidad reducida a tetraciclina de acuerdo con los valores de corte epidemiológico, y fueron clasificadas como población “Non Wild Type”. Para el estudio genotípico de estos aislamientos, se desarrolló y estandarizó una PCR múltiple capaz de detectar los genes de resistencia previamente mencionados. Los resultados obtenidos en este estudio, demostraron una alta frecuencia de aparición de los genes *tetA* y *tetB* (51.2% y 49.4%

respectivamente), el gen *tetM* sólo fue hallado en 7.7% de las muestras analizadas, mientras que el gen *tetC* no se encontró en ninguna de las cepas aisladas. La presencia de plásmidos pudo observarse en 61 de las cepas analizadas, de los cuales tan solo 8 plásmidos contenían algún gen de resistencia a tetraciclina. Lo que permite suponer que la transferencia de estos genes se realiza de forma horizontal por conjugación e involucra elementos integrativos como transposones o secuencias de inserción.

Palabras Clave: *Escherichia coli*, tetraciclina, genes de resistencia, animales de producción.

ABSTRACT

Phenotypic and genotypic evaluation of tetracycline resistance in strains of *Escherichia coli* of animal origin

During antimicrobials treatment, all bacteria present in the organism are exposed to selective pressure, especially in the intestinal tract, and genes selected in this way can be transferred horizontally. *Escherichia coli*, in particular, has a tendency to develop new resistance to antimicrobials in order to survive and can also act as a reservoir for these genes. This results in the natural selection of resistant strains, carriers of an important set of genes, with the ability to transmit them to other bacterial strains present in the human or animal intestine. Based on this, the objective of this thesis was to analyze the presence of different tetracycline resistance genes, the most commonly found in *Escherichia coli* of animal origin, *tetA*, *tetB* and *tetC*, involved in the efflux mechanism and the *tetM* gene, involved in ribosomal protection, and contribute to clarify the role of *Escherichia coli* in the transmission of such resistance genes. A total of 454 strains of *Escherichia coli* isolated from feces of broiler chickens, pigs and bovines of termination without clinical signs, were studied between the years 2006-2008 and 2010-2012; of which 281 strains (61.9%), showed reduced susceptibility for tetracycline according to the epidemiological cutoff values, and was classified as 'Non Wild Type' population. For the genotypic study of these isolates, a multiple PCR capable of detecting the previously mentioned resistance genes was developed and standardized. The results obtained in this study showed a high frequency of appearance of the *tetA* and *tetB* genes (51.2% and 49.4% respectively), the *tetM* gene was only found in 7.7% of the samples analyzed, while the *tetC* gene was not found in none of the isolated strains. The presence of plasmids could be observed in 61 of the analyzed strains, of which only 8

plasmids contained some tetracycline resistance gene. This allows us to suppose that the transfer of these genes is carried out horizontally by conjugation and involves integrating elements such as transposons or insertion sequences.

Keywords: *Escherichia coli*, tetracycline, resistance genes, production animals.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Antibióticos y Antimicrobianos

1.1.1 - El descubrimiento de los antibióticos. Un hito histórico

El término genérico "antibiótico" se utiliza aquí para denotar cualquier clase de molécula orgánica que inhiba o mate a las bacterias mediante interacciones específicas con dianas bacterianas, sin ninguna consideración de la fuente del compuesto o clase particular.

Debido a que los antibióticos (ATB) han sido considerados tradicionalmente como los compuestos producidos de forma natural por microorganismos o derivados semisintéticos de los mismos, mientras que los antimicrobianos (ATM) son derivados sintéticos, ambos, con actividad inhibitoria o bactericida específica frente a las bacterias y algunos también con actividad frente a determinados parásitos, utilizaremos esta diferencia en la terminología a lo largo de este trabajo de tesis doctoral.

En los primeros años del siglo XX el médico y bacteriólogo alemán Paul Ehrlich (1854-1915), desarrolló el concepto de "*toxicidad selectiva*", referido a la actividad selectiva frente a microorganismos pero no frente a células humanas, y descubrió los primeros agentes quimioterapéuticos, anteriores a los antibióticos, de los cuales el salvarsán, compuesto por arsénico y usado para el tratamiento de la sífilis, fue el más famoso. Más tarde Gerhard Domagk (1895-1964), patólogo alemán, tomando como base los estudios de Erlich sobre colorantes, descubrió en 1932 la actividad del Rojo Prontosil, precursor de las sulfamidas, compuestos sintéticos, en el tratamiento de infecciones estreptocócicas. Dicho hallazgo, publicado en 1935, lo hizo merecedor del Premio Nobel de Medicina en 1939.

En el año 1928, Alexander Fleming, médico y bacteriólogo escocés (1881-1955), descubrió de manera fortuita la penicilina, observando cómo un moho, *Penicillium notatum*, que contaminaba una de sus placas de cultivo inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Fleming caracterizó el producto

y en referencia al género *Penicillium* le denominó penicilina. Este hallazgo fue publicado en el año 1929 en el *British Journal of Experimental Pathology*, sin embargo, pasaron 10 años hasta que los investigadores Howard Florey y Ernst Chain desarrollaron métodos para el análisis y ensayo de la penicilina y recién en 1941 comenzó su producción en gran escala para uso civil y militar, de gran ayuda en las infecciones de los soldados de la II Guerra Mundial. Todos estos hallazgos hicieron a estos tres científicos merecedores del Premio Nobel de Medicina en 1945. El descubrimiento de la penicilina, que fue el primer compuesto natural con actividad antibacteriana, supuso un hito en la historia de la medicina y un antes y un después en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Poco a poco la industria farmacéutica inició una carrera para obtener nuevas moléculas de ATB a partir de diferentes microorganismos, preferentemente del suelo, o derivados semisintéticos de los mismos. Se descubrieron una gran variedad de estos compuestos pertenecientes a muy diversas familias, betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclina, macrólidos, etc. Asimismo, empezaron a tener su mayor auge cuando se emprendieron modificaciones biosintéticas de moléculas que fueron producidas a través de la síntesis química dando lugar a los ATM, que fueron también empleados en terapéutica humana y animal.

Sin embargo, la edad de oro de los ATB y los ATM resultó ser corta. Cada día se encuentran nuevas cepas de bacterias que han adquirido resistencia a compuestos que usualmente se empleaban para su control (Fig. 1). Un ejemplo típico de este comportamiento es el de *Neisseria gonorrhoeae*. En la década de 1960, la mayoría de los casos de gonorrea podían tratarse con penicilina o ampicilina. En la actualidad, más del 24% de las bacterias productoras de la gonorrea de los Estados Unidos son resistentes a al menos uno de los dos ATM y el 98% de las bacterias productoras de la gonorrea del Sudeste de Asia son resistentes a la penicilina (Lahra, 2012). La resistencia a los ATM existe desde siempre: la evolución de las cepas resistentes es un fenómeno de selección natural. Pero en los últimos tiempos se ha visto acelerado principalmente por el uso inapropiado de estos compuestos.

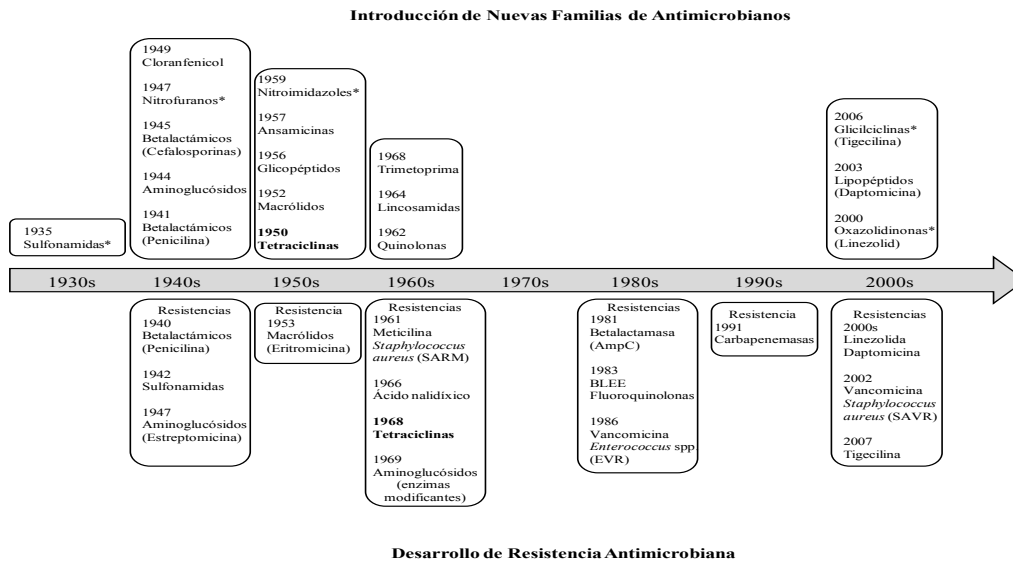


Figura 1: Años de introducción y de desarrollo de resistencia antimicrobiana de las distintas familias de compuestos de importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. De: Torres, 2012.

*: Antimicrobianos de naturaleza sintética

El lipopéptido, daptomicina, se descubrió en la década de 1980 pero no fue aprobado para su uso por la FDA hasta 2003. Por otro lado, la cantidad de nuevos compuestos antibacterianos aprobados en Estados Unidos disminuyó de 33 entre 1985 y 1999 a 13 entre 2000 y 2014. En general, sólo uno de cada cinco compuestos contra enfermedades infecciosas que ingresa a las pruebas clínicas está aprobado para pacientes humanos. Los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que en la actualidad sólo hay 51 compuestos en pruebas clínicas en áreas prioritarias para tratar infecciones causadas por los patógenos resistentes a los ATM. Sin embargo, sólo ocho de estas moléculas con potencial terapéutico han sido clasificadas por la OMS como tratamientos innovadores que ofrecerán alternativas válidas. Además, hay muy pocos compuestos antibacterianos en fase de desarrollo que se podrán administrar por vía oral. De todas maneras, la obtención de nuevos tratamientos no bastará para combatir la amenaza de la resistencia a los ATB y ATM. La OMS trabaja con los países y los asociados para mejorar la prevención y el tratamiento de las infecciones, para promover el uso correcto de los ATB y ATM y elabora directrices sobre el uso responsable de los

mismos en los sectores de la salud humana, animal y en la agricultura y ganadería. Este informe confirma que el mundo se está quedando sin ellos (WHO, 2017).

1.1.2.-Estrategias de uso y consumo de los ATM en Veterinaria

Durante el tratamiento ATM todas las bacterias del organismo humano/animal están expuestas a una presión selectiva por parte de los ATM, especialmente en el tracto intestinal (TI) durante la terapia por vía oral. Esto da como resultado la selección natural de cepas resistentes portadoras de un importante bagaje genético capaz de transferir genes de resistencia a otras cepas bacterianas presentes en el intestino humano/animal. Además, las bacterias resistentes presentes en alimentos contaminados consumidos por el hombre, pueden actuar como reservorio de genes o donantes de genes de RAM (Aarestrup y col., 2000).

Los ATB y ATM se emplean en los animales para los dos mismos usos que en humanos, el uso terapéutico y el uso profiláctico; sin embargo, existe una tercera y cuarta forma de uso que sí es específica de animales, el uso metafiláctico y su empleo como agentes de promotores de crecimiento (APC), creando otro frente de generación de resistencias. El fin del uso terapéutico es el de combatir las infecciones producidas por bacterias sensibles y se realiza en todas las especies animales, para consumo humano, mascotas domésticas y animales silvestres en cautiverio. En este caso el ATM se dosifica en forma individual según el peso del animal, con dosis terapéuticas y la duración del tratamiento dependerá del tipo de infección, 10 a 14 días o más. El objetivo del uso profiláctico es el de prevenir la aparición de infecciones en situaciones de riesgo, uno de los ejemplos es la administración previa a ciertas cirugías, la administración también es individual, según el peso del animal, a las mismas dosis que las terapéuticas y, en general, se administran por única vez. El uso metafiláctico es un caso especial en que los ATM se usan para tratar y prevenir infecciones. Generalmente se emplea en grupos de animales, producción de aves, cerdos, bovinos, donde se detectan signos de un brote de

enfermedad infecciosa y se medica tanto a los animales sanos, para prevenir, como a aquellos con signos clínicos, para curar. Se considera como un tipo de profilaxis en presencia de enfermedad. La dosificación es poblacional, se medican los animales en el agua o con el alimento y se utilizan dosis y esquemas posológicos terapéuticos aunque, debido a la forma de administración, la dosificación es irregular. El uso como APC es el agregado de ATM como suplemento en la dieta de animales de producción, aves, cerdos, bovinos y otras explotaciones de carácter intensivo, con el fin de incrementar la ganancia de peso y mejorar el rendimiento. En este caso no hay enfermedad infecciosa diagnosticada ni tampoco se trata de prevención justificada de enfermedades infecciosas, sino que se trata a animales sanos. La administración de ATM es en forma continua con el agua o la comida y en dosis subterapéuticas. Este uso no terapéutico de ATM en veterinaria es el más cuestionado dado que promueve la aparición de RAM en las poblaciones bacterianas.

Los APC fueron respaldados por primera vez a mediados de la década de 1950, cuando se descubrió que las cantidades pequeñas, subterapéuticas de ATB como la penicilina y la tetraciclina procaína, 1/10 a 1/100 de la cantidad de una dosis terapéutica, suministrados a animales en la alimentación, podrían optimizar la digestión de los alimentos más eficientemente mejorando la calidad del producto con un menor porcentaje de grasa y mayor contenido de proteínas en la carne de las aves de corral, cerdos y ganado de carne en crecimiento (Moore y col., 1946; Stokestad y Jukes, 1950). Esta práctica en la producción animal ha sido practicada por alrededor de 50 años en los Estados Unidos y en otros países. Aunque el mecanismo de acción no está claro, se cree que los APC suprimen poblaciones sensibles de bacterias en el intestino y, teniendo en cuenta que estimativamente el 6% de la energía neta en la dieta podría perderse debido a la fermentación microbiana, controlando la microbiota es posible que la pérdida de energía pueda ser desviada al crecimiento (Jensen, 1998).

Durante muchos años, se defendieron los efectos positivos de esta práctica, mientras que las consecuencias negativas no fueron detectadas. La primera acción que se llevó a cabo para evitar los

posibles efectos negativos fue en el año 1969 cuando Swann presentó un informe al Parlamento Británico en el cual sugirió que no se usaran como APC, ATM de las mismas clases que las usadas en medicina humana, lo que llevó al desuso de las tetraciclinas y penicilinas como APC. A partir de ahí, microbiólogos y expertos en enfermedades infecciosas sostuvieron las posibilidades de daño de que podrían ser ocasionadas por este uso (Gorbach, 2001; Howells y Joynson, 1975; Levy, 2002; Smith y Crabb, 1957). Ellos encontraron que las granjas que utilizaban APC tenían bacterias más resistentes en la microbiota intestinal de los trabajadores agrícolas y animales de granja que en la microbiota de los trabajadores y los animales en granja que no los utilizaban. En 1975 se llevó a cabo un estudio prospectivo *in vivo /in situ* para evaluar el efecto de la introducción de una dosis baja de oxitetraciclina en el alimento como APC en la microbiota intestinal de los pollos y los habitantes de la granja (Levy y col., 1976). Los resultados no sólo mostraron la colonización de los pollos con otras cepas de *Escherichia coli* resistentes a tetraciclina (TET) y otros ATM, sino también la adquisición de resistencia en *Escherichia coli* en la microbiota intestinal de la familia de la granja. Durante las siguientes tres décadas otros estudios dilucidaron aún más las relaciones cuantitativas y cualitativas entre el uso de ATM en la alimentación de animales, y el problema de tratamiento de las infecciones bacterianas resistentes a los medicamentos en los seres humanos (Aarestrup y Carstensen, 1998; Hershberger y col., 2005; Witte, 2000). Recientemente, en Bélgica, se realizó un estudio longitudinal durante 2 años en vacunos productores de alimentos de 25 granjas con el fin de investigar la relación entre el uso de ATM y la ocurrencia de RAM en el tracto digestivo y respiratorio. Este estudio demostró una alta presión de selección en 4174 cepas de *Escherichia coli* y en 474 cepas bacterianas del género *Pasteurellaceae*, convirtiendo no sólo la microbiota comensal del tracto digestivo sino también las bacterias patógenas oportunistas del tracto respiratorio en reservorios de resistencias múltiples (Boudewijn y col., 2016).

La preocupación por la aparición y propagación de resistencia apoya la eliminación de los APC en Europa en 1993 y gran parte del mundo basado en el "principio de precaución", que establece que, cuando la evidencia apunta hacia el potencial de una actividad para causar un daño generalizado o irreparable para la salud pública o el medio ambiente, las opciones para evitar los daños deben ser examinadas y perseguidas, incluso si el daño no se entiende o está totalmente probado (Kriebel y col., 2001). Sin embargo, la evidencia científica concreta frente a las consecuencias favorables y desfavorables de los APC no es clara para todas las partes interesadas. Si bien muchos esperaban que, los años de experiencia después de la prohibición del uso de APC y los datos sustanciales que muestran una elevada RAM en bacterias y productos alimenticios asociados con animales alimentados con los APC, era una señal clara del fin de esta práctica, los argumentos siguen, en gran parte debido a una relación costo/beneficio y la falta de evidencia científica sólida (Marshall y Levy; 2011).

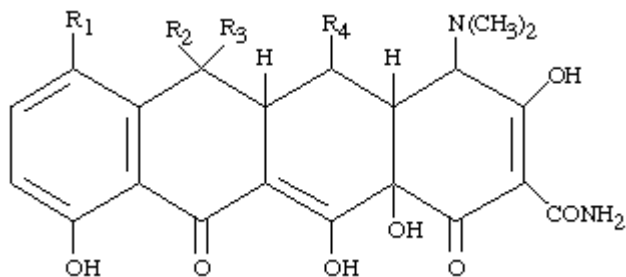
1.2.- Tetraciclinas

1.2.1.- Estructura química y clasificación

A fines de la década de 1940 se descubrieron las primeras tetraciclinas, clortetraciclina y oxitetraciclina, metabolitos producidos por *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus*, respectivamente. Las siguientes fueron moléculas naturales producidos por una mutante de *Streptomyces aureofaciens* en el caso de la dimetilclortetraciclina y por *Streptomyces viridifaciens* en el caso de la TET, representante genérico del grupo, la cual se produce también de forma semisintética por deshalogenación catalítica de la clortetraciclina. Los demás compuestos son productos semisintéticos. Químicamente, todas poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos fusionados derivados de la naftacenocarboxamida policíclica (Fig. 2). La suma de diferentes grupos funcionales ha dado lugar a numerosos compuestos que pueden agruparse en tres generaciones según el orden de su descubrimiento, las de primera generación desde el año 1948 hasta

1963, las de segunda generación desde el año 1965 al 1972 y las de tercera generación las del año 1993, las glicilciclinas. Los miembros principales de la clase tetraciclinas se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Figura 2: Estructura química de la TET



Estructura conservada

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Origen
Tetraciclina	H	CH ₃	OH	H	<i>Streptomyces viridifaciens</i>
Clortetraciclina	Cl	CH ₃	OH	H	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Oxitetraciclina	H	CH ₃	OH	H	<i>Streptomyces rimosus</i>
Minociclina	N(CH ₃) ₂	H	H	H	Semisintético
Doxiciclina	H	CH ₃	H	OH	Semisintético

Tabla 1: Miembros principales de tetraciclinas

Nombre genérico	Año descubrimiento/desarrollo	Vía administración
Clortetraciclina	1948	Oral
Oxitetraciclina	1948	Oral y parenteral
Tetraciclina	1953	Oral
Dimetilclortetraciclina	1957	Oral
Rolitetraciclina	1958	Oral
Limeciclina	1961	Oral y parenteral
Clomociclina	1963	Oral
Metaciclina	1965	Oral
Doxiciclina	1967	Oral y parenteral
Minociclina	1972	Oral y parenteral
Tigeciclina	1993	Parenteral

De: Chopra y Roberts 2001

1.2.2- Farmacocinética

Estos fármacos comparten características comunes y sólo difieren en algunos aspectos farmacocinéticos. La absorción de las tetraciclinas es variable por vía oral, para la clortetraciclina es de sólo del 30%, del 60 al 80% para la oxitetraciclina, demeclociclina y TET y del 95 al 100% para la doxiciclina y minociclina. La absorción es mayor en ayuno y disminuye por la ingestión concomitante de productos lácteos, geles de hidróxido de aluminio, sales de calcio, magnesio, hierro o zinc y subsalicilato de bismuto. El mecanismo que explica esta menor absorción se debe a la quelación de cationes bi y trivalentes. Se distribuyen ampliamente en el organismo, en secreciones incluida la orina y líquido prostático. Se acumulan en células retículo endoteliales de hígado, bazo, y médula ósea; en hueso, dentina y esmalte de dientes que no han brotado. Se logran concentraciones apropiadas en líquido cefalorraquídeo y sinovial, así como en lágrimas, saliva y leche materna. Cruzan la barrera placentaria, llegan al tejido fetal y al líquido amniótico. Se unen en un 40 a 80% a las proteínas del plasma. Se eliminan principalmente por vía renal y por la bilis, aunque algunas son reabsorbidas por la circulación enterohepática. La oxitetraciclina y TET tienen una vida media de 6 a 12 h, y la de demeclociclina es de 16 h y es más larga para la doxiciclina y minociclina de 16 a 18 h.

Son considerados ATM de amplio espectro por poseer actividad antimicrobiana hacia un gran rango de microorganismos incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, clamidias, micoplasmas, riketsias y protozoarios.

Son ATM de bajo costo, usados extensivamente en la profilaxis y el tratamiento de infecciones en humanos y animales, también son utilizados como APC en animales de producción a niveles subterapéuticos (van den Bogaard y Stobbering, 2000) y en agricultura y acuicultura.

1.2.3.- Mecanismo de acción

Las tetraciclinas son una familia de ATM cuyo mecanismo de acción es unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, de manera que se inhibe la síntesis de proteínas al evitar la unión del aminoacil-ARNt en la posición A del ribosoma (Chopra y Roberts, 2001). Para interactuar con el sitio diana, en Gram negativos, las moléculas del ATM cargadas positivamente atraviesan la membrana externa, por el potencial Donnan, a través de las porinas de dicha membrana: OmpF y OmpC, (Chopra y col., 1992; Schnappinger y Hillen, 1996) formando un complejo ión catiónico-antibiótico. Este complejo se acumula en el periplasma, donde probablemente se disocia para liberar la TET sin carga positiva, dejando una molécula débilmente lipofílica capaz de difundir a través de las regiones lipídicas de la membrana citoplasmática. La entrada de TET a través de la membrana citoplasmática es energía dependiente (Schnappinger y Hillen, 1996; Nikaido y Thanassi, 1993). En el citoplasma, es posiblemente quelada, si el pH interno y la concentración de los iones bivalentes son mayores que en la parte externa de la célula (Schnappinger y Hillen, 1996). La unión de las tetraciclinas al ribosoma es reversible dando una explicación del efecto bacteriostático (Chopra y col., 1992). La ausencia de actividad sobre las células eucariotas explica las propiedades selectivas de este ATM. A nivel molecular resulta de poca importancia la inhibición de la síntesis proteica en los ribosomas de 80S (van den Bogert y Kroon, 1981) y la escasa acumulación del ATM en las células eucariotas (Franklin, 1966).

Las tetraciclinas se han utilizado ampliamente en los últimos cuarenta años como agente terapéutico en medicina humana y veterinaria, y también como APC en la ganadería. La aparición de resistencia bacteriana a los ATM en la actualidad ha limitado su uso. Actualmente, las tetraciclinas de tercera generación, glicilciclinas ya han presentado resistencia en cepas de *Salmonella* (Tuckman y col., 2000). Esta resistencia a glicilciclina es mediada por el gen *tetA* que ha adquirido una mutación adicional.

1.3.- Resistencia Antimicrobiana

Se define la resistencia antimicrobiana (RAM) a la capacidad de una bacteria de sobrevivir a la exposición de una concentración definida de un antimicrobiano (OIE, 2003).

1.3.1- Origen de los genes de resistencia. El resistoma antibiótico

En genética, en general, la mayor consideración está enfocada en la transferencia vertical, aunque en la actualidad se sabe que la transferencia horizontal de genes es un fenómeno significativamente mayor y entre los organismos unicelulares posiblemente es la forma dominante de transferencia genética (Edwards, 2010; Arnold, 2011). La presencia de dichos reservorios explicaría la rápida diseminación de la RAM de las bacterias comensales a las patógenas. La transferencia horizontal de genes es la primer causa de la RAM (OECD, 2010; Kay y col., 2002; Koonin y col., 2001; Nielsen, 1998), jugando un rol importante en la evolución bacteriana, degradando nuevos compuestos creados por el hombre (McGowan y col., 1998) y manteniendo y transmitiendo factores de virulencia (Keen, 2012). Los elementos móviles son la principal fuerza impulsora en la transferencia horizontal de genes entre cepas, especies y géneros cercanos y filogenéticamente distantes y son responsables de la rápida propagación de elementos particulares en toda una comunidad bacteriana y entre los ecosistemas (Roberts, 2011).

Los genes de resistencia de las bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas han revelado secuencias casi idénticas, lo que sugiere que la transferencia de genes de RAM a través de géneros se ha producido. Además, se sugiere que estos eventos de transferencia se han producido recientemente debido a la alta identidad de secuencia (Courvalin, 2008).

Durante mucho tiempo, el principal objetivo en investigación en el área de la RAM estaba relacionado con la emergencia en patógenos humanos y su epidemiología. Sin embargo, la presencia de genes de resistencia en las bacterias patógenas sólo supone una mínima parte. La hipótesis más

aceptada durante mucho tiempo acerca del origen de muchos de estos genes de resistencia ha sido que los propios microorganismos productores de ATB los poseían como mecanismos de defensa frente a estos compuestos que ellos mismos sintetizaban, los cuales podrían ser posteriormente transferidos a las bacterias patógenas. En la última década, diversos grupos de investigación han demostrado que las bacterias ambientales, especialmente las procedentes del suelo, contienen una gran diversidad de genes de resistencia, algunos similares a los detectados en las bacterias patógenas y muchos otros nuevos (Canton, 2009; D'Costa y col., 2007; Forsberg y col., 2012). Por otro lado, se han observado grandes semejanzas estructurales entre algunos ATB y otras moléculas que participan en el metabolismo microbiano. Por lo tanto, es posible que algunos genes de resistencia tengan una doble función: inactivar a los ATB y actuar en procesos celulares como detoxificación, señalizadores en la comunicación intercelular o en procesos biosintéticos, entre otros (Baquero y col., 2002; Wright, 2007). Todo esto hace pensar que el origen de los genes de resistencia es un tema mucho más complejo de lo inicialmente considerado.

En este contexto, ha surgido el concepto del resistoma antibiótico que comprende el conjunto de todos los genes que contribuyen directa o indirectamente a la RAM. Dicho resistoma antibiótico estaría constituido por: a) los genes de resistencia de los microorganismos ambientales, muchos de ellos procedentes del suelo, tanto productores como no productores de ATB, resistoma ambiental; b) los genes de resistencia de las bacterias patógenas, resistoma clínico; c) los genes intrínsecos presentes en los cromosomas bacterianos que contribuyen a la resistencia, resistoma intrínseco; y d) los genes que codifican proteínas metabólicas pero que podrían ser los precursores de genes de resistencia a los ATB a través de procesos evolutivos y que han sido denominados genes de protorresistencia (Wright, 2010) .

La RAM es la respuesta evolutiva a la fuerte presión selectiva que resulta de la exposición a estos compuestos. El apoyo a la hipótesis de la probabilidad de la resistencia como resultado del uso contemporáneo de estos fármacos en la clínica y en las granjas es la poca frecuencia de resistencia a los

ATM en las colecciones de bacterias patógenas que son anteriores a la era de los antibióticos (Wright, 2010). La RAM ha ocurrido en la naturaleza desde la antigüedad (D'Costa, 2011), mucho antes de la era antibiótica y lo que ha hecho el hombre en las 7 décadas de uso masivo de los ATB ha sido acelerar tremendamente el proceso evolutivo. Se estima que en el planeta puede haber alrededor de 5×10^{30} procariotas y sólo una fracción mínima está relacionada con enfermedades infecciosas en el hombre (Wright, 2010). Los microorganismos, muchos de ellos del suelo, están expuestos a la acción selectiva de los ATB producidos por otros microorganismos o liberados al medio tras su uso en humanos, animales o plantas, o a la acción de otros compuestos tóxicos, entre ellos metales pesados, biocidas, etc., de diversos orígenes y por ello han tenido que desarrollar estrategias de defensa frente a todos estos compuestos. Todos estos genes del resistoma ambiental pueden ser movilizados por mecanismos de transferencia horizontal a bacterias, tanto patógenas como no patógenas, de otros ecosistemas, incluyendo el compartimento humano, animal o el acuático entre otros. Al conjunto de todas estas plataformas de movilización de genes de resistencia más otras funciones que existen en la naturaleza se lo denomina moviloma. Los microorganismos ambientales constituyen el origen evolutivo de los genes de la RAM y existe una enorme cantidad y diversidad de los mismos en la naturaleza. El estudio del resistoma, entendido desde esta perspectiva global, es complejo pero permitirá entender las bases moleculares de la resistencia, su origen y su evolución, así como comprender porque la resistencia es tan prevalente y emerge tan rápidamente después de la incorporación de los ATM en la clínica. El siguiente paso sería estudiar en mayor profundidad los mecanismos de movilización por transferencia horizontal de estos genes del resistoma ambiental a las bacterias patógenas.

Con todo lo anteriormente expuesto, podemos decir que la emergencia y evolución de la RAM es un proceso tremendamente complejo y multifactorial (Baquero, 2012) que depende de:

- 1) la presión selectiva de los ATM de diferente procedencia, medicina, veterinaria, agricultura o sintetizados por los microorganismos productores, sobre el conjunto de microorganismos que

componen el microbioma ambiental, humano y animal. Es posible que otros compuestos no ATB tales como biocidas, detergentes, metales pesados, etc., también influyan en este proceso selectivo;

2) la existencia de un complejo resistoma que contiene un “*pool*” de genes de resistencia muy diverso y abundante en continua evolución;

3) la presencia de plataformas genéticas eficaces que permiten la captación de los genes de resistencia, por ejemplo integrones y su posterior movilización como los plásmidos, transposones, fagos, etc.;

4) la incorporación de los genes de resistencia en clones bacterianos epidémicos que presenten facilidad para diseminarse en diferentes nichos, hospitales, comunidad, granjas, etc.;

5) la posibilidad de que los clones bacterianos se encuentren en comunidades microbianas con alta capacidad de transferencia de genes (Figura 3).

Las nuevas herramientas de la metagenómica están permitiendo abordar el estudio de todas estas piezas que intervienen en el proceso de la resistencia y posiblemente, en un futuro, tengamos un mayor conocimiento de las rutas de evolución. Todos estos conocimientos son fundamentales, asimismo, para poder predecir en un futuro como puede evolucionar la resistencia ante la incorporación de nuevos ATM. Además, serán de gran utilidad para el diseño de nuevos fármacos utilizando la estrategia eco-evo, la cual tiene en cuenta el resistoma antibiótico y los aspectos evolutivos de la resistencia (Baquero, 2012).



Figura 3: El resistoma antibiótico y los distintos ámbitos implicados en el mismo
De: Wright, 2010 modificado por Torres Manrique, 2012.

1.3.2.- Efectos de los Antimicrobianos en la Microbiota Intestinal. Transferencia de genes de Resistencia Antimicrobiana

Fisiológicamente, la microbiota del TI realiza la fermentación de los residuos alimentarios y el moco endógeno no digerible, la recuperación de energía en forma de ácidos grasos de cadena corta, la producción de la vitamina K, la absorción de iones, el control de la proliferación y de la diferenciación de las células epiteliales, el desarrollo y la homeostasis del sistema inmune y la protección contra los patógenos por el efecto de barrera. Una relación simbiótica entre las bacterias y el huésped proporciona a éste una protección óptima. Por otra parte, el huésped proporciona nutrientes a las bacterias y éstas proporcionan una barrera para la colonización. El uso de ATB y ATM como tratamiento crea una perturbación en la microbiota del TI; la barrera se rompe y bacterias potencialmente patógenas pueden colonizar el intestino. Los ATM crean una presión selectiva sobre la microbiota intestinal y se corre el riesgo de un crecimiento excesivo de cepas resistentes (Guarner y Malagelada, 2003). Esto, a su vez, aumenta el riesgo de transferencia de genes de RAM entre la microbiota normal y, en el peor de los casos, su transferencia a otras bacterias patógenas. El riesgo de desarrollar cepas resistentes a los ATM que pueden transmitirse por contacto de individuo a individuo y la propagación de los genes de resistencia, pueden ser disminuidos por la elección de ATM con un mínimo efecto en la microbiota intestinal (Sullivan, 2001).

A pesar de los intentos por frenar el desarrollo de la RAM el nivel de bacterias resistentes está en aumento y la hipótesis de que el TI actúa como reservorio de genes de RAM está ampliamente aceptada (Graselli y col., 2008). Un estudio en humanos voluntarios en 1974 mostró que la RAM se produjo por transferencia de genes de resistencia entre una *Escherichia coli* autóctona de origen animal y una cepa de *Escherichia coli* en el TI humano durante el tratamiento con TET. Esta transferencia fue observada a los 36 días posteriores a la finalización del tratamiento, pero sólo con la administración de

niveles terapéuticos de TET 1000 mg/día y no con niveles subterapéuticos de 50 mg/día (Burton, 1974).

Se sugiere que parte de la microbiota Gram negativa tiene una mayor perspectiva de obtener genes de resistencia, actuando como reservorio y transfiriendo estos genes a bacterias patógenas, las cuales producirán infecciones con posibilidades de tratamiento limitadas (Schjørring y col., 2008).

La sustentabilidad de la RAM se debe en parte a la selección de bacterias resistentes ya que se convierten en la nueva población dominante en el medio ambiente. Además, el uso de ATM insta a las bacterias sensibles a volverse resistente a fin de sobrevivir (Schjørring y Krogfelt, 2011). Se sabe que los genes responsables de la RAM están presentes en los microorganismos, proporcionándoles autoprotección a los compuestos ATB que producen como mecanismo de defensa contra otros microorganismos. Las similitudes entre los genes y mecanismos de resistencia que se encuentran en los microorganismos productores de ATB y en las bacterias patógenas sugieren que los primeros son el grupo de origen de genes de RAM (Courvalin, 2008; Mazodier y Davies, 1991).

La RAM se puede presentar a través de cuatro mecanismos: alteración del sitio de unión, desactivación enzimática del ATM, disminución de la droga acumulada y alteración de algún paso sensible en el metabolismo de la misma. Los tres primeros mecanismos pueden estar mediados por mutaciones en genes específicos cromosomales o por adquisición de plásmidos portadores de genes de resistencia. El cuarto, se atribuye principalmente a la transferencia horizontal de genes de resistencia localizados en plásmidos, transposones e integrones; por lo que el uso continuo y la acumulación de ATM en el medio ambiente ha dado como resultado el incremento de bacterias resistentes a los mismos (Roberts, 2011; Schjørring y Krogfelt, 2011).

1.3.3.- Mecanismos de resistencia a TET

La resistencia a TET es mayormente debida a la adquisición de nuevos genes, plásmidos y transposones, y es producida teóricamente durante la colonización de la microbiota, lo que permite el intercambio de genes y la propagación de los mismos a lo largo de diferentes ecosistemas (Roberts, 1997). Un limitado número de bacterias adquieren la resistencia por mutaciones, alterando la permeabilidad de la membrana externa a nivel de las porinas y/o los lipopolisacáridos, cambiando la regulación del sistema de eflujos o modificando el ARNr de 16S. Los genes de resistencia a este ATM se denominan *tet*.

Existen, hasta el presente, 43 diferentes genes *tet/otr* conocidos, con una amplia distribución entre las especies que confieren resistencia a las tetraciclinas (Tabla 2), de los cuales 17 (39%) se encuentran en bacterias ambientales (Tabla 3) (Roberts, 2011). Veintisiete de los genes codifican para las proteínas de eflujo dependiente de energía, 12 codifican para las proteínas de protección ribosomal, 3 codifican para enzimas inactivantes y un gen que presenta un mecanismo de resistencia desconocido.

El mecanismo de resistencia más común en tetraciclinas es a través del sistema de eflujo que libera el ATM al exterior de la célula bacteriana.

Proteínas de eflujo: las proteínas de eflujo son las más estudiadas dentro de las proteínas Tet. Estas proteínas están asociadas a la membrana y remueven la TET presente en el interior de la bacteria. Son capaces de reducir las concentraciones intracelulares de TET mediante el intercambio de un protón en el complejo de tetraciclina-catión contra un gradiente de concentración y requieren para su función de células bacterianas intactas (Palm y col., 2008). De esta manera no se logra la concentración adecuada del ATM para actuar en el ribosoma. El eflujo de TET es alcanzado por una exportación de proteínas de la superfamilia facilitadora principal (MFS) cuyos productos incluyen más de 300 proteínas individuales. Todos los genes *tet* de eflujo codifican para dichas proteínas asociadas a la

membrana. Estos genes se encuentran presentes en bacterias Gram positivas y Gram negativas, saprófitas y patógenas del hombre, animales y ambientales (Tablas 2 y 3).

Los genes que codifican este mecanismo de resistencia en las bacterias Gram negativas son *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetY* y *tetI*, todos ellos previamente informados en *Escherichia coli* (Chopra y Roberts, 2001).

Veintiséis de los 27 genes de eflujo confieren resistencia a TET y doxiciclina, pero no a minociclina y tigeciclina, mientras que los *tetB* en bacterias Gram-negativas confieren resistencia a la TET, doxiciclina y minociclina. Doce de los genes de eflujo se encuentran en bacterias ambientales (Tabla 3).

Se han identificado setenta y seis géneros de bacterias Gram-negativas y 47 géneros de bacterias Gram-positivas que llevan genes de resistencia a TET para este mecanismo. El gen *tetB* es el gen de eflujo más común entre las bacterias Gram-negativas y se ha identificado en 31 géneros, el *tetA* en 20 géneros, el *tetC* en 10 géneros, el *tetD* en 16 géneros, el *tetE* en 10 géneros, el *tetG* en 13 géneros, el *tetH* en 8 géneros, y el *tet35* en 2 géneros. El gen *tetK* se encuentra en 12 géneros de bacterias Gram-positivas y el gen de *otrB* se encuentra en *Mycobacterium* spp. y en *Streptomyces* spp. El gen *tetL* se encuentra en 14 géneros de bacterias Gram-negativas y en 19 géneros de bacterias Gram-positivas, el *tet39* en 4 géneros de Gram-negativas y en 3 géneros de Gram-positivas, mientras que el *tet42* se encuentra en 4 géneros de bacterias Gram-positivas y en 2 géneros de Gram-negativas. Doce de los genes de eflujo incluyendo el *tetJ*, *tetAP*, *tetV*, *tetY*, *tetZ*, *tet30*, *tet31*, *otrC*, *tcr*, *tet33*, *tet40* y *tet41* se encuentran en un solo género. El *tet43* fue aislado de una biblioteca de ADN metagenómico y aún no se ha identificado en un género, ni especie bacteriana específica.

Protección de proteínas ribosomales: la protección a los ribosomas de la acción de la TET es mediada por una proteína citoplasmática soluble de ~72.5 kDa que comparte homología con las

GTPasas que participan en la síntesis proteica. Estas proteínas tienen similitud de secuencia con los factores de elongación ribosomal, EF-G y EF-Tu y se agrupan en la superfamilia del factor de traducción de GTPasas (Leipe y col., 2002). Hipotéticamente interactuarían con la proteína ribosomal h34 dando como resultado una interrupción alostérica de la unión primaria de TET y en consecuencia, la liberación de la droga (Connell y col., 2003a, b). Confieren resistencia a la TET, doxiciclina, minociclina y pero no a tigeiclina (Roberts, 2005). Confieren resistencia a un mayor espectro de tetraciclinas que las proteínas de eflujo a excepción de TetB. Las proteínas TetM y TetO reducen la susceptibilidad de los ribosomas a las TET. A diferencia de la acción de las proteínas de eflujo que para actuar necesitan las membranas intactas, este mecanismo funciona *in vivo* e *in vitro*. Las proteínas TetM y TetO son las más estudiadas y caracterizadas dentro de este grupo (Sanchez y cols., 2004; Schnappinger y Hillen, 1996; Schrag y cols., 1997; Taylor y Courvalin, 1988; Taylor y cols., 1998).

Existen, hasta el presente, 12 genes de protección ribosomal de los cuales tres *tetBP*, *otrA* y *tet* son exclusivos de bacterias ambientales (Tabla 3). El gen *tetM* se ha identificado en aislamientos clínicos en *Enterococcus* spp. entre 1954 y 1955, aproximadamente al mismo tiempo que se identificaron los primeros genes de eflujo en Gram-negativas (Watanabe, 1963; Atkinson y cols., 1997). Así, tanto los genes *tet* de eflujo como los genes de protección ribosomal han estado en la población bacteriana durante un tiempo considerable.

Se han caracterizado cuarenta y nueve géneros de bacterias Gram-negativas que llevan uno o más genes *tet* de protección ribosomal. Treinta y ocho géneros de bacterias Gram-positivas son portadores de estos genes, de los cuales 15 llevan un solo gen y 23 llevan uno o más genes de protección ribosomal y /o de protección ribosomal más genes de eflujo. El gen *tetM* es el más comúnmente encontrado en bacterias, identificado en 36 géneros de bacterias Gram-negativas, y en 31 géneros de Gram-positivas, *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp., *Streptomyces* spp., y *Ureaplasma* spp. El gen *tetW* se ha identificado en 25 géneros, 15 en Gram-negativas y 10 en Gram-

positivas, el gen *tetQ* se ha identificado en 22 géneros, 12 en Gram-negativas y 10 en Gram-positivas, el gen *tetO* se ha encontrado en 20 géneros, 8 de Gram-negativas y 12 de Gram-positivas, el gen *tetS* se ha identificado en 7 géneros, 3 en Gram-negativas y 4 en Gram-positivas, mientras que el gen *otrAse* ha encontrado en 3 géneros de bacterias Gram-positivas, los genes *tetT*, *tet32* y *tet44* se han encontrado en 2 géneros de Gram-positivas cada uno, el gen *tet* se ha identificado en *Streptomyces* spp. y el *tetB* P se ha encontrado en un género de Gram-positivas. El gen *tetBP* es característico entre los genes de protección ribosomal ya que todos los aislamientos que llevan este gen también llevan el gen *tetAP* que codifica una proteína de eflujo inducible (Johansson y col., 2004). El gen *tetAP* sólo confiere resistencia a TET para el huésped bacteriano, mientras que no está claro si el gen *tetBP* por sí solo confiere niveles clínicamente relevantes de resistencia a TET.

Inactivación enzimática de TET: este mecanismo implica a una proteína citoplasmática que modifica químicamente la TET. Esta reacción tiene lugar sólo en presencia de oxígeno y NADPH y no funciona en el huésped natural, *Bacteroides* spp. El único ejemplo descrito hasta el momento es el producto del gen *tetX* (Speer y col., 1991). Fue descubierto como parte de dos transposones, íntimamente relacionados en *Bacteroides* spp. y aún no ha sido encontrado en otro género bacteriano.

Hasta el momento se conocen tres genes enzimáticos de inactivación de tetraciclinas, el gen *tetX* que codifica para una monooxigenasa NADP dependiente de flavina y que inactiva, por la adición de un grupo hidroxilo, a la posición C-11 del ATM. Esta acción requiere oxígeno y confiere resistencia a la TET, doxiciclina, minociclina, y tigeciclina y se encuentra en dos géneros bacterianos (Yang y col., 2004; Moore y col., 2005). El gen *tet37* que codifica para una monooxigenasa NADP-dependiente, sólo ha sido clonado a partir del metagenoma oral y no ha sido identificado de ningún aislamiento. El gen *tet34* se ha encontrado en tres géneros de bacterias Gram-negativas, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. y *Vibrio* spp. y es único para las bacterias del medio ambiente (Nonaka y Suzuki, 2002).

Otros mecanismos de resistencia: El gen *tetU* produce una proteína pequeña, 105 aminoácidos, que confiere resistencia de bajo nivel a TET (Chopra y Roberts, 2001). La secuencia génica no muestra homología significativa con los genes de proteínas de eflujo ni con los de proteínas de protección ribosomal. La proteína TetU tiene 21% de similitud a la proteína TetM, pero no incluye las secuencias de consenso de unión a GTP, que se cree son de importancia en estas proteínas para la resistencia a TET. El gen *tetU* se ha identificado sólo en *Enterococcus faecium* (Ridenhour y col., 1996).

Tabla 2: Mecanismos de Resistencia para los genes *tet* y *otr*

Genes
Bombas de eflujo (27) <i>tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetH, tetJ, tetV, tetY, tetZ, tet 30, tet 31, tet 33, tet 35^(a), tet 39, tet 41, tetK, tetL, tet 38, tetAP, tet 40, tet 42, tet 43, otrB, otrC, tcr3</i>
Protección ribosomal de proteínas(12) <i>tetM, tetO, tetS, tetW, tet32,tetQ, tetI, tet36, otrA, tetBP^(b), tet44, tet</i>
Modificación enzimática (3)^(c) <i>tetX, tet34, tet37</i>
Mecanismos no descritos (1)^(d) <i>tetU</i>

Adaptado de: Roberts, 2011

^(a) No está relacionado con otros genes *tet* de eflujo; *tet37, tet43*.

^(b) *tetBP* no se halla solo y *tetAP* y *tetBP* funcionan como un operon.

^(c) *tetX* y *tet37* no están relacionados pero los dos requieren NADP- oxidoreductasas.

^(d) Su secuenciación no parece estar relacionada ni con la bomba de eflujo ni con la protección ribosomal de proteínas.

Tabla 3: Genes de Resistencia en bacterias ambientales

Genes
Bombas de eflujo (12/27) <i>tetAP, tetV, tet 30, tet 35, tet 33, tet 39, tet 41, tet 42, tet 43, otrB, otrC, tcr3</i>
Protección ribosomal de proteínas(3/12) <i>tetBP, otrA, tet</i>
Modificación enzimática (2/3)^(c) <i>tetX^(a), tet34</i>

Adaptado de: Roberts, 2011

^(a) *tetX* es funcional sólo en *Spingobacterium* spp., aunque se encuentra en *Bacteroides* spp.

1.4.- *Escherichia coli*

1.4.1.- Clasificación taxonómica

Escherichia coli, de acuerdo al Manual Bergey de bacteriología sistemática, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Comprende bacterias Gram negativas cilíndricas de 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o de a pares. Conforme a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacterias quimioheterótrofas facultativas teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β-galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles y normalmente reducen nitrato a nitrito. En general, fermentan la lactosa y no producen hidrógeno sulfurado. Se recuperan con facilidad a partir de muestras clínicas sembradas en medios comunes o selectivos, Agar MacConkey, Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), etc., e incubadas a 37°C bajo condiciones aeróbicas.

El género *Escherichia* comprende cinco especies siendo *Escherichia coli* la especie tipo. Las principales pruebas fisiológicas que distinguen *Escherichia coli* de las demás especies son producción de indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, producción de lisina descarboxilasa, y fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol (Scheutz y Strockbine, 2005).

Escherichia coli es una de las especies bacterianas comensales que se utilizan como bacterias indicadoras, tanto en los estudios de contaminación fecal como en los de seguimiento y monitoreo de la RAM (SVARM, 2005). *Escherichia coli* posee una tendencia a desarrollar nuevas resistencias a los ATM por la presión selectiva de su uso durante la vida del huésped y/o desarrollar mutantes resistentes con el fin de sobrevivir y mantener la homeostasis microbiana en el tracto intestinal, además de actuar como reservorio de genes (OIE, 2001; WHO, 1997).

1.4.2.- Sensibilidad antimicrobiana

Al igual que el resto de las bacterias Gram negativas, *Escherichia coli* es intrínsecamente resistente a los ATM hidrofóbicos, como macrólidos, novobiocina, rifampicina, actinomicina D y ácido fusídico (Scheutz y Strockbine, 2005). La resistencia a estos compuestos se atribuye, en parte, a la baja permeabilidad que presenta la membrana externa bilaminar a los solutos lipofílicos. Sin embargo, el mecanismo de eflujo activo puede tener un efecto sinérgico, en ciertos casos, sobre la resistencia. La capacidad de *Escherichia coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que ésta debe determinarse siempre. *Escherichia coli* puede presentar resistencia adquirida frente a aminoglucósidos, β lactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprima. Alrededor del 40 al 90% de las cepas de *Escherichia coli* son resistentes a la ampicilina, estreptomina, tetraciclinas y sulfamidas y entre el 15 y el 30% de las cepas son resistentes a las cefalosporinas de 1^a generación, neomicina, kanamicina, cloranfenicol y quinolonas. Entre los ATM que presentan menores tasas de resistencias se encuentran: amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de 2^a y 3^a generación, gentamicina, tobramicina, ampicilina, colistina y polimixina B (Blanco y col., 2002).

Las bacterias TET resistentes con genes *tet* se hallan en cepas patógenas, oportunistas y miembros de la microbiota normal. Pueden aislarse de humanos, animales, alimentos y del medio ambiente (Levy y col., 1989; Naik y col., 1994; Roberts, 1994; Roberts, 1996; Taylor y Chau, 1996).

1.4.3. - Multiresistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* comensal

El mecanismo de defensa bacteriano más eficiente y sofisticado es la adquisición de Resistencia a Múltiples Drogas (MDR). Este se caracteriza por la compleja interacción de diferentes mecanismos, por ejemplo: eflujo de fármaco, inactivación enzimática y la protección del sitio diana, que confieren resistencia simultánea a tres o más grupos de ATM. La MDR llegó a establecerse ampliamente especialmente en bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli*, considerada una especie

versátil que forma parte de la microbiota intestinal y que abarca diferentes patotipos. En contraste con las cepas patógenas, que están en el foco de la terapia, las cepas comensales son generalmente marginadas en muchos aspectos, debido a su reducida importancia clínica. Abordado como posibles reservorios de determinantes de resistencia, la prevalencia de la RAM en *Escherichia coli* comensales a partir de animales destinados al consumo se controla periódicamente en varios países de Europa, Japón, Australia, Estados Unidos, Canadá, etc.; sin embargo, sus atributos genéticos, tales como la coexistencia y propagación de genes de resistencia y su capacidad para colonizar el intestino humano no se consideran adecuadamente (Szmolka y Nagy, 2013).

De manera similar a otras enterobacterias, *Escherichia coli* puede elegir entre varios mecanismos para defenderse del efecto simultáneo de varios ATM. Ciertas estructuras proteicas, que median el flujo de salida simultánea de una amplia gama de ATM de las células, o causan disminución de permeabilidad de la membrana, son partes de antiguos mecanismos en su mayoría codificados cromosómicamente que causan MDR en diferentes poblaciones de *Escherichia coli*. Además, la mayoría de los genes que codifican una amplia variedad de mecanismos de resistencia son transportados por elementos genéticos móviles lo que favorece la cotransferencia de genotipos resistentes a múltiples ATM entre bacterias comensales y patógenas, entre los animales y los seres humanos y viceversa (Iyer y col., 2013).

1.4.4.-Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Teniendo en cuenta el concepto actual de moviloma, los epidemiólogos necesitan estar al tanto de los cambios emergentes en la sensibilidad bacteriana, para permitir que se consideren medidas de control apropiadas (CLSI, 2011). En un intento por superar los problemas de las diferencias en los criterios interpretativos basados en datos clínicos o epidemiológicos, el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ha decidido definir puntos de división separados para

la detección de bacterias con mecanismos de resistencia. Para la vigilancia del desarrollo de la misma, se utilizan valores de corte epidemiológicos: “Wild Type Cutoff Values” (WCV), “Epidemiological Cutoff” (ECOFF) o “Epidemiological Cutoff Values” (ECV), también conocido como resistencia microbiológica, y para la orientación de la terapia se utilizan puntos de corte clínicos o “Clinical Breakpoints” (Kahlmeter y col., 2003). Los WCV, ECOFF o ECV se determinan sobre la base de la distribución de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para un agente antimicrobiano y una especie bacteriana determinada. EUCAST recopila datos de CIM de rango completo de la mayor cantidad de fuentes posibles. Los datos se insertan en una base de datos y cada distribución se examina para su aceptación, para luego publicarlos libremente a disposición. Aunque el uso de los WCV, ECOFF o ECV es importante para la detección temprana de la sensibilidad disminuida, este valor es inapropiado para determinar el porcentaje de resistencia clínica (Simjee y col., 2008). Esto se debe a que hay casos en que un aislamiento bacteriano tendrá un valor de CIM por encima del WCV, ECOFF o ECV, pero por debajo del punto de corte clínico sensible; en este caso, dicho aislamiento será clínicamente sensible y, por lo tanto, no debe categorizarse como resistente sino como con sensibilidad disminuida o reducida, epidemiológicamente (Emborg y col., 2007).

De hecho, al informar datos usando WCV, ECOFF o ECV, los términos “sensible” o “resistente” son inapropiados; en cambio, las bacterias deben informarse como población “Wild Type” (WT) si la CIM cae por debajo del valor de corte epidemiológico y como población “Non Wild Type” (NWT) si la CIM es más alta que el valor de corte epidemiológico (Schwarz y col., 2010). Por lo tanto, las poblaciones de microorganismos sin un mecanismo de resistencia adquirida fenotípicamente detectable se definen como bacterias WT y las poblaciones que claramente se apartan de las poblaciones WT se clasifican como NWT.

1.5.-Situación en nuestro país

En Argentina existen antecedentes bibliográficos sobre caracterización fenotípica de resistencia a TET en cepas de *Escherichia coli* aisladas de animales, no así sobre la caracterización genotípica.

En un trabajo publicado en 2007 por Moredo y col., sobre 64 cepas de *Escherichia coli* aisladas de materia fecal de cerdos entre los años 2005 y 2006, se observó 93% de resistencia a TET. En una publicación de Pantozzi y col. en 2010, sobre 240 cepas de *Escherichia coli* aisladas de animales domésticos entre los años 2006 y 2008, se hallaron 8.8% de resistencia a TET en 45 cepas bovinas, 21% en 19 cepas ovinas, 5.7% en 35 cepas equinas, 88.3% en 43 cepas porcinas, 75.5% en 49 cepas de aves y 20.4% en 49 cepas de caninos. Vigo y col. en el año 2011, observó 100% de resistencia a TET en 14 cepas de origen aviar y 67% de resistencia en las 15 cepas origen porcino estudiadas. Por otra parte, Carloni y col. en el mismo año, publicó un 48% de resistencia a TET en 25 cepas de *Escherichia coli* de origen bovino, 75% de resistencia en 8 cepas de origen equino, 36.5% de resistencia en 52 cepas de origen canino y 34% en 15 cepas de origen felino.

En la bibliografía consultada sobre antecedentes en determinación de genes de resistencia a TET en nuestro país, sólo se halló un trabajo sobre detección de determinantes de resistencia a TET y oxitetraciclina en cepas de *Bacillus cereus* aisladas de muestras de miel (López y col., 2008).

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Hipótesis

- Las cepas resistentes a TET de *Escherichia coli* aisladas de materia fecal de diferentes especies animales poseen genes que codifican dicha resistencia.
- Los genes de resistencia a TET de *Escherichia coli* varían según la especie animal involucrada.
- Los genes de resistencia a TET de *Escherichia coli* varían según el período de tiempo estudiado.
- Si la cepa de *Escherichia coli* posee más de un gen que codifica para resistencia aumenta la CIM.

2.2.- Objetivo general

- El objetivo del trabajo de tesis es determinar y analizar diferentes genes de resistencia a TET, los más comúnmente hallados en *Escherichia coli* de origen animal.
- Contribuir a esclarecer el rol de *Escherichia coli* de origen animal en la resistencia a TET.

2.2.- Objetivos particulares

- Evaluar la sensibilidad a TET según el método de CIM en cepas de *Escherichia coli* de materia fecal de animales de terminación clínicamente sanos.
- Identificar los genes involucrados en la resistencia a TET según la especie animal (aves, porcinos y bovinos).
- Identificar los genes involucrados en la resistencia a TET en dos períodos de tiempo: años 2006-2008 y 2010-2012.
- Comparar los genes involucrados en la resistencia a TET según el período de tiempo y la especie animal.
- Determinar la prevalencia de los genes de resistencia involucrados en las cepas previamente identificadas como población NWT.
- Analizar la relación entre fenotipo y genotipo y comparar los genes de resistencia a TET en *Escherichia coli* involucrados en las diferentes especies animales en los dos períodos estudiados.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.-CEPAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

3.1.1.-Muestreo

Las cepas de *Escherichia coli* estudiadas se aislaron a partir de materia fecal de pollos parrilleros, bovinos y porcinos, entre los años 2006-2008 y 2010-2012. Las muestras se remitieron en bolsas de polietileno o recipientes cerrados y refrigeradas hasta su procesamiento. En aves se remitió el intestino. Todas las muestras provenían de animales sanos, sin signología clínica, destinados al sacrificio/consumo de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos.

En el período 2006-2008 se obtuvieron 50 muestras de cada especie animal, 150 muestras totales, y en el período 2010-2012 el número de muestras por especie animal fue 120, 360 muestras totales.

3.1.2.-Aislamiento de *Escherichia coli*

Las muestras de materia fecal fueron sembradas en EMB e incubadas a 37°C por 24-48 horas en atmósfera normal. A partir de este primer aislamiento se tomaron entre 1 o 3 colonias con características macroscópicamente compatibles con *Escherichia coli*, brillo metálico de color verde azulado, y se repicaron en Agar Trypticase Soya (ATS), incubándose a 37°C por 24-48 horas en atmósfera normal. La identificación bacteriana se realizó en base a las pruebas para enterobacterias: oxidasa, reducción de nitratos a nitritos, fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa, producción de hidrógeno sulfurado, prueba del indol, utilización del citrato, lisina y ornitina decarboxilasas, fenilalanina desaminasa e hidrólisis de la urea. Las cepas fueron almacenadas a -20°C, en crioviales con 2 ml de caldo tripticase soya más 30 % de glicerol, hasta su uso.

3.1.3-Determinacion fenotípica de sensibilidad a tetraciclina

La prueba de sensibilidad antimicrobiana se realizó por el método de dilución en agar de la CIM según el protocolo del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). La CIM es definida como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo bacteriano. Las diluciones seriadas de TET se realizaron en un rango de 0.5µg/ml a 64 µ/ml en agar Müeller Hinton. El inóculo bacteriano se preparó en caldo Müeller Hinton con una densidad ajustada a la escala 0.5 de McFarland y diluída 1:10. La siembra de las cepas se realizó mediante un replicador de Steers, quedando el inóculo final de 10⁴ UFC/ml. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera normal por el término de 16 a 20 horas. Como cepa control se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2.- ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

3.2.1.- Diseño de *primers* utilizados en el estudio genotípico

El diseño de *primers* se basó en los determinantes de resistencia a TET con mayor prevalencia en *Escherichia coli*. En base a una búsqueda bibliográfica (Bryan y col., 2004; Chopra y Roberts, 2001; Lanz y col., 2003; Sayah y col., 2005; Schwaiger y col., 2010; Stine y col., 2007), se decidió incluir en este estudio los genes *tetA*, *tetB* y *tetC* involucrados en el mecanismo de eflujo de salida y el gen *tetM* implicado en la protección ribosomal. Además, se diseñó un par de *primers* específicos para el gen del ARNr 16S, capaz de amplificar cualquier cepa de *Escherichia coli*, para ser utilizado como control de amplificación interno en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de este modo eliminar la posibilidad de obtener resultados que sean falsos negativos.

Como punto de partida para el diseño de los *primers*, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de cada uno de los genes previamente mencionados. Las secuencias empleadas fueron obtenidas de la base de datos GenBank, al menos 20 secuencias de cada uno de los genes, en todos los

casos se intentó reunir un grupo de secuencias lo más heterogénea posible seleccionando cepas aisladas en distintos hospedadores y en diferentes países y años.

El alineamiento de cada grupo de secuencias se realizó con el software *CLUSTAL-X*. A partir de las regiones conservadas en cada alineamiento, se diseñaron los diferentes pares de *primers* específicos, teniendo en cuenta que las temperaturas de *annealing* fueran similares y que el producto de amplificación obtenido con cada uno fuera fácilmente distinguible en una PCR múltiple.

El software AnnHyb v4.944 se utilizó para prevenir la formación de estructuras internas como horquillas, homodímeros y heterodímeros durante la reacción de PCR. Finalmente se realizó un alineamiento local usando el software *BLASTn* (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide, disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comprobar la especificidad de los *primers* diseñados. Los *primers* fueron sintetizados por encargo en Integrated DNA Technology (IDT, Coralville, IA, USA).

3.2.2.-Método de extracción del ADN

Inicialmente, se evaluaron simultáneamente tres técnicas de extracción para seleccionar el mejor método de obtención del ADN genómico. Para ello, tres cepas de *Escherichia coli* resistentes a TET, tomadas al azar, fueron cultivadas en 10 ml de caldo Luria Bertani (LB) con 12,5 mg / ml de TET, y se incubaron durante 24 horas a 37 ° C con agitación.

3.2.2.1- Lisis celular por ebullición

- 1- Centrifugar 2 ml de cada cultivo bacteriano a 12.000 g durante 5 minutos
- 2- Descartar el sobrenadante
- 3- Resuspender el pellet bacteriano, con pipeta, en 100 µl de agua tri-destilada libre de nucleasas

- 4- Hervir durante 10 minutos para producir la lisis celular
- 5- Centrifugar a $10.000 \times g$ durante 10 minutos para eliminar los restos celulares
- 6- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio, descartando el pellet.

3.2.2.2- Extracción con DNAzol

En este caso se utilizó el reactivo comercial DNAzol (Invitrogen), en base al protocolo del fabricante con ligeras modificaciones:

- 1- Centrifugar 2 ml de cada cultivo bacteriano a 13.000 g durante 2 minutos
- 2- Descartar el sobrenadante
- 3- Resuspender el pellet bacteriano, con pipeta, en 1 ml de DNAzol.
- 4- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- 5- Centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos
- 6- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio descartando el pellet
- 7- Agregar 500 μ l de Etanol absoluto
- 8- Mezclar por inversión e incubar 3 minutos a temperatura ambiente
- 9- Centrifugar a 4.000 g por 2 minutos
- 10- Descartar el sobrenadante
- 11- Agregar 500 μ l de etanol al 75%
- 12- Centrifugar a 4.000 g por 2 minutos
- 13- Repetir los pasos 10 al 12 una vez más
- 14- Descartar todo el sobrenadante
- 15- Dejar secar el pellet con el tubo invertido durante 5 minutos
- 16- Resuspender en pellet en 100 μ l de agua libre de nucleasas.

3.2.2.3- Extracción con kit comercial

Se utilizó el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) según las instrucciones del fabricante para bacterias Gram negativas:

- 1- Centrifugar 2 ml de cada cultivo bacteriano a 13.000 g durante 2 minutos
- 2- Descartar el sobrenadante
- 3- Resuspender el pellet bacteriano en 600 µl de *Nuclei Lysis Solution*
- 4- Incubar a 80 ° C durante 5 minutos para lisar las células.
- 5- Agregar 3 µl de solución de RNasa al lisado celular
- 6- Incubar a 37 ° C durante 30 minutos
- 7- Agregar 200 µl de solución de precipitación de proteínas. Mezclar vigorosamente con vortex durante 20 segundos e incubar en hielo durante 5 minutos
- 8- Centrifugar a 13,000 × g durante 3 minutos
- 9- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga
- 10- Agregar 600 µl de isopropanol. Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN formen una masa visible
- 11- Centrifugar a 13,000 × g durante 2 minutos
- 12- Descartar cuidadosamente el sobrenadante
- 13- Agregar 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente, mezclar por inversión suavemente
- 14- Centrifugar a 13,000 × g durante 2 minutos
- 15- Descartar todo el sobrenadante.
- 16- Dejar secar el pellet con el tubo invertido durante 5 minutos
- 17- Resuspender el pellet en 100 µl de agua libre de nucleasas.

En todos los casos, se recogió el ADN en 100 µl de agua libre de nucleasas. El rendimiento total de ADN se calculó por espectrometría midiendo la absorbancia 260 nm, infiriendo que una unidad de absorbancia equivale a 50 µg/ml de ADN, y la calidad del ADN se estimó por la relación de absorbancia 260/280nm, considerando que un valor de 1,8 corresponde a ADN puro. Por último, una alícuota de 5 µl de ADN total, obtenido por cada método, se cargó en un gel de agarosa al 1% para confirmar visualmente la cantidad y calidad del ADN obtenido.

3.2.3.-PCR simple

Con el fin de comprobar la especificidad de cada reacción de PCR y al mismo tiempo obtener controles positivos, necesarios para el posterior desarrollo de este trabajo, se probaron inicialmente todos los pares de *primers* de forma individual, a 20 cepas de *Escherichia coli* fenotípicamente resistentes a TET tomadas a azar.

Para la amplificación, se utilizó inicialmente, un protocolo estándar de PCR, con una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 52°C durante 45 segundos, y 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25µl con 12,5 µl de 2x GoTaq Green Master Mix (Promega) y 2 µl de molde de ADN, aproximadamente 200 ng de ADN total y una concentración 0.5 µM de cada primer. La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando un termociclador XP Cyler (BIOER). Los productos de PCR, 10 µl de cada uno, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE y posteriormente teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 mg/ml.

Después de verificar que cada par de *primers* amplificara un fragmento del tamaño esperado, se purificó un producto de cada gen amplificado usando el kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega) y se secuenció por el método de Sanger (Biotechnology Resource Center, University of

Cornell, Ithaca, USA). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa *BLASTn* (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide) para comprobar la identidad de los fragmentos amplificados y la especificidad de los *primers*.

3.2.4.-Optimización de la concentración de *primers*

Una vez hallados los controles positivos para cada una de las reacciones, se probaron distintas concentraciones de *primers* con el objetivo de disminuir la presencia de productos de amplificación inespecíficos. Al igual que en el caso anterior se utilizó, un protocolo estándar de PCR: 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos a 94°C durante 45 segundos, 52°C durante 45 segundos, y 72°C durante 1 minuto, seguido de un ciclo a 72°C durante 5 minutos utilizando un termociclador XP Cyclyer (BIOER). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl con 12,5 µl de 2x GoTaq Green Master Mix (Promega) y 2 µl de molde de ADN con aproximadamente 200 ng de ADN total. En este caso, se probaron tres concentraciones distintas de *primers* (0,4; 0,2 y 0,1 µM). Los productos de PCR, 10 µl de cada uno, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE y posteriormente teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 mg/ml.

3.2.5.-Optimización de las condiciones de *annealing*

Para determinar la temperatura de *annealing* óptima para la reacción de PCR, se probaron cinco temperaturas distintas en un mismo ciclado, utilizando un gradiente de temperatura de 53 a 61 °C, con un aumento de 2 °C por muestra. Al igual que en el casos anteriores, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl con 12,5 µl de 2x GoTaq Green Master Mix (Promega) y 2 µl de molde de ADN, aproximadamente 200 ng de ADN total y una concentración 0,1 µM de cada primer. La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando un termociclador XP Cyclyer (BIOER), utilizando el siguiente protocolo de ciclado:

Tabla 4: Parámetros de ciclado

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5'	1
94°C	45''	
53 – 55 – 57 – 59 – 61 °C	45''	40
72°C	1'	
72°C	5'	1

Los productos de PCR obtenidos, 10 µl de cada uno, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE y posteriormente teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 mg/ml.

3.2.6.-Optimización del número de ciclos

Para determinar el número de ciclos a utilizar, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) empleando las mismas condiciones de ciclado anteriormente establecidas. La qPCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl con 12,5 µl de 2x Mezcla Real (Biodynamics) y 2 µl de molde de ADN, aproximadamente 200 ng de ADN total, para cada uno de los genes a amplificar y una concentración 0,1 µM de cada uno de los *primers*.

Con el fin de evaluar la posible formación de dímeros de *primers* durante la reacción de mPCR, en este caso, también se agregó un control negativo compuesto por 12,5 µl de 2x Mezcla Real y 0,1 µM de cada uno de los *primers* en una misma mezcla de reacción pero sin el agregado de ningún molde, sólo agua destilada hasta completar un volumen final de 25 µl. La reacción de qPCR fue llevada a cabo utilizando un termociclador iQ5 real-time PCR (BioRad), y los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa iQ5 Optical System Software.

3.2.7.-PCR múltiple

Una vez halladas las condiciones óptimas para la reacción de amplificación de cada par de *primers* por separado, se procedió a evaluar el desempeño de los mismos en una reacción de amplificación múltiple (mPCR). Todos los *primers* en conjunto fueron evaluados contra cada uno de los controles positivos de cada gen, previamente identificados. Como el control negativo se utilizó agua destilada en lugar del molde, para comprobar la ausencia de productos formados por la dimerización de *primers*. También se incluyó como control positivo, una mezcla conteniendo todos los genes a detectar en una misma reacción, con el fin de corroborar la amplificación simultánea de los mismos.

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo de acuerdo al protocolo previamente optimizado (ver Anexo I). Los productos de PCR, 10 µl de cada uno, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE y posteriormente teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 mg/ml.

3.3.-ANÁLISIS GENÉTICO DE MUESTRAS DE CAMPO

Para determinar el número de muestras (n) a analizar, se utilizó un método estadístico no probabilístico condicionado a la resistencia al mínimo n por período, respetando la proporcionalidad de especies animales que hay con respecto a la mínima muestra.

Todas las cepas NWT halladas en el período 2006-2008 fueron incluidas en el estudio genotípico; y en base a esta prevalencia, 30/47 cepas aisladas de aves, 36/41 cepas aisladas de cerdos y 3/43 cepas aisladas de bovinos ($n=69$), se seleccionó por método estadístico, un n representativo de cepas aisladas de cada especie animal en el período 2010-2012 para incluirlas en el estudio de los genes de resistencia a TET.

En consecuencia, del período 2010-2012, de las 120 muestras por especie animal, un $n=99$ cepas se incluyeron en el estudio para identificar los genes asociados a la resistencia, 39/77 cepas

aisladas de aves, 40/107 cepas aisladas de cerdos y 20/28 cepas aisladas de bovinos de las cuales 3 se aislaron de bovinos provenientes de explotación extensiva (EE) y 17 de de bovinos provenientes de explotación intensiva (EI).

Los resultados de la distribución de las CIM y ECOFF, ECV ó WCV de las cepas incluidas por período y especie animal se reflejan en la Tabla 5.

Tabla 5: Distribución de CIM y ECOFF, ECV ó WCV de *Escherichia coli* incluidas en el estudio para identificar los genes asociados a la resistencia

Especie	n	Período	Distribución (n) de CIM (µg/ml)							
			0.5	1	2	4	8	16	32	≥64
Aves	30	2006-08							4	26
	39	2010-12			1		1		3	34
Cerdos	36	2006-08							5	31
	40	2010-12								40
Bovinos	3	2006-08								3
	20	2010-12						1*	7	12*

Las líneas verticales indican el valor de corte del ECOFF, ECV ó WCV.

La zona coloreada indica el número de bacterias pertenecientes a la población NWT, por encima del ECOFF, ECV ó WCV.

*: Explotación Extensiva 1 cepa de 16(µg/ml) y 2 cepas de 64(µg/ml)

3.3.1.- Determinación genotípica de la resistencia a tetraciclina

Para el análisis genotípico de los aislamientos de las cepas de campo se incluyeron en este estudio un total de 168 muestras, de acuerdo al análisis probabilístico explicado anteriormente. Las cepas seleccionadas fueron repicadas a medio líquido y posteriormente procesadas de acuerdo al protocolo de mPCR previamente optimizado (ver Anexo I).

Teniendo en cuenta que los genes de resistencia a TET pueden encontrarse tanto en el ADN cromosomal como en el ADN plasmídico y que el método de extracción empleado permite la purificación de ambos a la vez; una vez que se comprobó la presencia de al menos un marcador de resistencia en cada una de las muestras analizadas, se procedió a determinar su ubicación. Para

discriminar la presencia de plásmidos con genes de resistencia se realizó un nuevo análisis sobre las cepas incluidas en este estudio.

3.3.2.- Determinación de la presencia de marcadores de resistencia en plásmidos

En primer lugar se procedió a realizar una nueva extracción de ADN a partir de todas las cepas; en todos los casos, la extracción se realizó a partir de las cepas conservadas en caldo tripticosa soya con 30% de glicerol en freezer a -20°C. Una ansada de cada criovial fue repicada en ATS con 12,5 mg / ml de TET e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente se tomaron de 1 a 3 colonias, se sembraron en 5 ml de caldo LB con 12,5 mg / ml de TET, y se incubaron durante 24 horas a 37 ° C con agitación. Se utilizó un protocolo basado en la técnica original de Birnboim & Doly (1979) ligeramente adaptado, que favorece la purificación de ADN plasmídico.

Pasos del método de lisis alcalina para extracción de plásmidos:

- 1- Centrifugar 5 ml de cada cultivo bacteriano a 5000 x g durante 10 minutos
- 2- Descartar el sobrenadante
- 3- Resuspender el pellet bacteriano, con pipeta en 100 µl de Solución I
- 4- Añadir 200 µl de la Solución II mezclando suavemente por inversión (4 o 5 veces)
- 5- Incubar la mezcla resultante en hielo durante 5 minutos
- 6- Añadir 150 µl de la Solución III agitando por inversión
- 7- Incubar en hielo durante 5 minutos
- 8- Centrifugar a 14.000 x g durante 15 minutos a 4 °C
- 9- Transferir, aproximadamente 400 µl del sobrenadante, a un tubo limpio.
- 10- Añadir 2 volúmenes y medio, 1 ml, de etanol absoluto
- 11- Centrifugar a 14.000 xg durante 20 minutos a 4 °C

- 12- Lavar con 500 μ l de etanol al 70% frío
- 13- Secar el pellet a temperatura ambiente
- 14- Resuspender el ADN plasmídico en 30 μ l de agua tridestilada estéril.

Solución I: 50 mM glucosa 25 mM TrisHCl (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0)

Solución II: 0,2N NaOH 1% SDS

Solución III: 60 ml de 5M acetato de potasio (pH 4.8) 11,5 ml de ácido acético glacial.

El ADN obtenido por el método de la lisis alcalina fue tratado con RNasa A de páncreas bovino (Promega) a una concentración de 100 μ g/ml durante 30 min a 37°C.

A continuación, para determinar la presencia de plásmidos, 10 μ l de cada una de las extracciones fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE y posteriormente teñidas con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 mg/ml.

Las muestras en las que se observó la presencia de al menos un plásmido, fueron posteriormente utilizadas para transformar una cepa de *Escherichia coli* sensible a TET.

3.4.- OBTENCIÓN DE BACTERIAS QUÍMICAMENTE COMPETENTES

Para la obtención de bacterias químicamente competentes, se inoculó en 1 ml de caldo LB, una colonia de una cepa de *E. coli* K12 y se incubó durante 24 horas a 37 ° C con agitación. Al día siguiente se realizó una dilución 1/100 del cultivo, con caldo LB fresco, 50 μ l de cultivo más 4950 μ l de medio, en un tubo Falcon de 15 ml, y se incubó aproximadamente durante 2.30 horas a 37 ° C con agitación, hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm (Abs_{600}) de 0,5.

Protocolo para la obtención de bacterias químicamente competentes:

- 1- Centrifugar a 3.000 x g durante 5 minutos a 4 °C
- 2- Descartar el sobrenadante
- 3- Resuspender el pellet bacteriano en 500 µl de una solución 100 mM de MgCl₂
- 4- Incubar en hielo durante 15 minutos.
- 5- Centrifugar a 3.000 x g durante 5 minutos a 4 °C
- 6-Resuspender el pellet bacteriano en 500 µl de una solución 100 mM de CaCl₂
- 7- Incubar en hielo durante 15 minutos
- 8- Centrifugar a 3.000 x g durante 5 minutos a 4 °C
- 9- Resuspender el pellet bacteriano en 1 ml de una solución mixta conteniendo partes iguales de MgCl₂ 100 mM y CaCl₂ 100 mM.

Las bacterias químicamente competentes obtenidas fueron utilizadas en el momento para la transformación o almacenadas en alícuotas de 100 µl con 30% de glicerol durante un mes a -70°C.

3.4.1.- Transformación

Para realizar las transformaciones se utilizaron de 100 a 200 ng, aproximadamente 2 µl, de los plásmidos previamente obtenidos, y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml conteniendo 100 µl de la suspensión de bacterias químicamente competentes. La mezcla fue incubada durante 10 minutos en hielo, luego se sometió a un choque térmico de 42°C durante 90 segundos y se pasó rápidamente a hielo durante otros 10 minutos. Finalmente se añadieron 900 µl de medio SOC (Bacto-Triptona 20g/l; Extracto de levadura 5g/l; NaCl 10mM; MgSO₄ 10mM; MgCl₂ 10mM; Glucosa 20mM) y se incubaron durante 2 horas con agitación suave a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se sembraron 100 µl del cultivo en 5 ml caldo LB con 12,5 mg / ml de TET, y se incubaron durante 24 horas a 37 ° C con

agitación. A partir de los tubos en los que se observó desarrollo bacteriano, *Escherichia coli* resistentes a TET, se realizó una nueva mPCR (ver Anexo I) para determinar la identidad de los genes adquiridos.

Los productos de PCR de las muestras positivas a alguno de los genes *tet* fueron posteriormente secuenciados (Unidad de Genómica – Instituto de Biotecnología – C.I.C.VyA – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) y analizados mediante el uso del programa *BLASTn*, para determinar el grado de homología entre las cepas estudiadas y otras cepas previamente reportadas en la base de datos.

4.-RESULTADOS

4.1.- CEPAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

4.1.1.-Aislamiento de *Escherichia coli*

En el período 2006-2008, de las 50 muestras recolectadas por cada especie animal, se aislaron *Escherichia coli* en 47 de las muestras provenientes de aves, 41 de cerdos y 43 de bovinos. En el período 2010-2012, de las 120 muestras recolectadas por especie animal, se aislaron *Escherichia coli* en 95 de las muestras tomadas en aves, 109 en cerdos y en las 119 muestras de bovinos, de las cuales 60 provenían de bovinos de explotación intensiva (EI) y 59 de explotación extensiva (EE). Es decir que, sobre un total de 510 muestras recolectadas en ambos periodos de muestreo, se logró aislar *Escherichia coli* en 454 cepas (89.0%), 131 correspondientes al periodo 2006-2008 y 323 al periodo 2010-2012.

4.1.2.- Determinación fenotípica de sensibilidad a tetraciclina

De las 454 cepas de *Escherichia coli* analizadas por el método de la CIM, 281 cepas (61.9%) correspondieron a una población NWT, considerando como punto de corte epidemiológico una concentración de TET de 8µg/ml (EUCAST). Al analizar los resultados obtenidos en ambos periodos de muestreo por separado, se observó que en el periodo 2006-2008, 69 cepas de un total de 131 cepas aisladas (52.7%) correspondieron a una población NWT; mientras que para el periodo 2010-2012, 212 cepas de las 323 aisladas en este periodo (65.6%) superaban el valor de corte.

Los resultados de la sensibilidad ATM por el método de la CIM de los dos períodos de muestreo y por especie animal se expresan en la Tabla 6.

Tabla 6: Distribución de CIM y ECOFF, ECV ó WCV de *Escherichia coli* aisladas de aves, cerdos y bovinos en los periodos 2006-2008 y 2010-2012

Especie	n	Período	Distribución (n) de CIM (µg/ml)							
			0.5	1	2	4	8	16	32	≥64
Aves	47	2006-08				16	1		4	26
	95	2010-12		1	4	8	5	13	13	51
Cerdos	41	2006-08		2	2	1			5	31
	109	2010-12			1	1			2	105
Bovinos	43	2006-08	2	27	11					3
	EE	59	2010-12	7		16	23	10	1	2
	EI	60	2010-12		1	11	15	8	2	12

EE. Explotación Extensiva, EI: Explotación Intensiva

Las líneas verticales indican el valor de corte del ECOFF, ECV ó WCV.

La zona coloreada indica el número de bacterias pertenecientes a la población NWT, por encima del ECOFF, ECV ó WCV.

Los resultados de sensibilidad a TET de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de las muestras de las diferentes especies animales del período 2006-2008, fueron realizados y publicados previamente al desarrollo de esta tesis doctoral (Pantozzi y col., 2010). El método utilizado fue el de Kirby Bauer o de difusión en agar con discos, según las recomendaciones del CLSI (2006). A las cepas resistentes por este método se les realizó la CIM como se describió anteriormente.

4.2.- ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

4.2.1.- Diseño de *primers* utilizados en el estudio genotípico

De acuerdo a la bibliografía consultada el gen de resistencia a tetraciclina más frecuentemente hallado en *Escherichia coli* es *tetA* (50,81%), seguido por los genes *tetB* y *tetC* (26,49% y 14,05% respectivamente). Si bien, la frecuencia de aparición del gen *tetM* en *E. coli* es baja (2,16%) también se decidió agregar este gen en el estudio ya que involucra un mecanismo de resistencia diferente, por bomba de eflujo, a los anteriormente mencionados. Existen más genes de resistencia a TET en *Escherichia coli*, *tetD*, *tetE*, *tetY*, entre otros, pero fueron excluidos de este estudio ya que su frecuencia de aparición es muy baja. Por otro lado, se diseñó un par de *primers* específicos para el gen

ribosomal 16S (*rna16S*) con el objetivo de utilizarlo como control de amplificación interno de la PCR.

Los datos están expresados en la tabla 7.

Tabla 7: Diseño de *primers* utilizados en el estudio genotípico

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño
<i>tetA</i>	<i>tetA-F</i>	TTTCGGCGAGGATCGCTTTCCTG	283
	<i>tetA-R</i>	ATCCACCTGCCTGGACAACATTGC	
<i>tetB</i>	<i>tetB-F</i>	TGATAGGCCAAATTCCCAGCAACGG	376
	<i>tetB-R</i>	ACACCGGTTGCATTGGTAAGGCTC	
<i>tetC</i>	<i>tetC-F</i>	AGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTT	446
	<i>tetC-R</i>	TAAGAGCCGCGAGCGATCCTTGAA	
<i>tetM</i>	<i>tetM-F</i>	ATCGAGGTCCGCTCTGAACTTTGCG	588
	<i>tetC-R</i>	TTGGCGGCACTTCGATGTGAATGG	
RNA16S	16S-F	ATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGC	819
	16S-R	ACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGG	

4.2.2.- Método de extracción del ADN molde

Debido a que en los tres métodos de extracción del ADN molde utilizados, el volumen inicial de cultivo y el volumen final en el que se resuspendió el ADN fueron iguales, 2 ml y 100 μ l respectivamente, fue posible realizar una comparación directa de los resultados obtenidos por espectroscopía. Resultados expresados en la tabla 8.

Tabla 8: Comparación de los diferentes métodos de extracción del ADN molde

Método de extracción	Concentración	Abs₂₆₀/Abs₂₈₀
Lisis celular por ebullición	206,7 ± 61,6 ng / µl	1,44 ± 0,36
Extracción con DNAzol	107,2 ± 47,2 ng / µl	1,71 ± 0,18
Wizard Genomic DNA Purification Kit	162,3 ± 25,8 ng / µl	1,77 ± 0,04

El bajo valor de la relación de absorbancias 260/280 obtenido para las muestras tratadas por ebullición indicó que, el ADN obtenido no se encontraba puro y por lo tanto la concentración estimada para estas muestras no era fiable. Esto puede deberse a una contaminación por ARN y proteínas, lo cual luego fue confirmado en un gel de agarosa (Fig. 4).

Los mayores niveles de concentración y pureza se lograron al utilizar el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit. Sin embargo, se seleccionó al DNAzol, como el método más apropiado para este estudio debido a que, siendo los rendimientos y la pureza obtenidos por ambos métodos similares (Tabla 8 y Fig. 4), el DNAzol es un método más sencillo y económico.

Además, el Wizard Genomic DNA Purification Kit fue especialmente diseñado para la extracción de ADN genómico y por lo tanto tiene poca eficiencia para la recuperación de ADN plasmídico, sobre todo si es de bajo peso molecular; mientras que con el DNAzol se puede obtener simultáneamente ADN genómico y plasmídico, siendo este un punto importante a tener en cuenta ya que algunos genes de resistencia podrían estar contenidos en plásmidos.

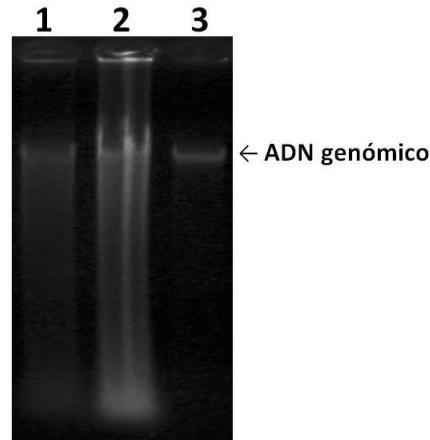


Figura 4: ADN genómico obtenido a partir de una misma cepa de *Escherichia coli*, por tres métodos distintos: (1) DNazol, (2) Lisis por ebullición y (3) kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit.

4.2.3.-PCR simple

Con esta metodología, se pensó que sería fácil encontrar al menos una cepa con cada gen de resistencia seleccionado. Para los genes *tetA*, *tetB*, *tetM* y los genes 16S no hubo inconvenientes, sin embargo, después de procesar 20 muestras, no se encontró ninguna cepa que contuviera el gen *tetC*. Para resolver este problema, se decidió utilizar como control positivo para el gen *tetC*, una cepa de *Escherichia coli* previamente transformada con el vector pBR322, debido a que este plásmido contiene una copia del gen *tetC*. Una vez subsanado este inconveniente, se logró obtener al menos un control positivo para cada uno de los genes (Fig. 5)

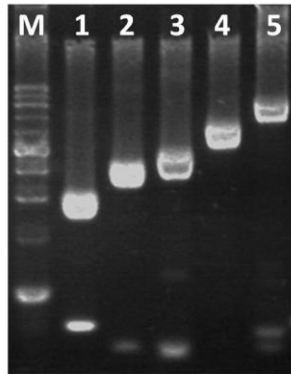


Figura 5: Amplificación por PCR simple: (M) Marcador de peso molecular (100bp – Promega), (1) amplificación del gen *tetA*, (2) amplificación del gen *tetB*, (3) amplificación del gen *tetC*, (4) amplificación del gen *tetM*, (5) amplificación del gen *rna16S*.

Como puede observarse en la figura anterior, si bien se logró amplificar un producto del tamaño deseado con cada uno de los *primers*, en muchos casos se observó la presencia de algunas bandas accesorias, posiblemente debidas al pegado inespecífico de los *primers* (*mispriming*).

Al secuenciar los productos de PCR específicos, las secuencias obtenidas resultaron ser idénticas o muy similares a otras secuencias del GenBank para cada uno de los genes utilizados en este estudio. Por lo tanto, se pudo comprobar que los *primers* previamente diseñados amplificaban un fragmento del tamaño esperado y eran específicos.

4.2.4.-Optimización de la concentración de *primers*

Al analizar la influencia de la concentración de *primers* en la reacción de PCR, se observó que en todos los casos esta concentración no alteraba la amplificación de los productos específicos, sin embargo en algunos casos, hubo una clara disminución de los productos de amplificación inespecíficos al utilizar concentraciones de *primers* más bajas, principalmente para los genes *tetC* y *rna16S* (Fig. 6).

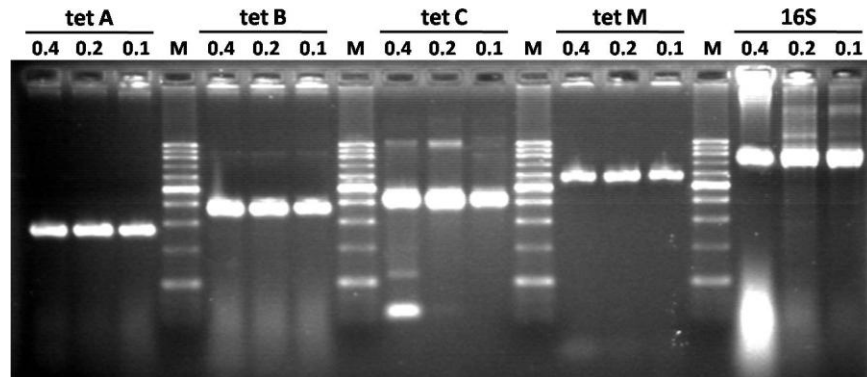


Figura 6: Amplificación de cada uno de los genes con distintas concentraciones de *primers* (0,4; 0,2 y 0,1 μM)

En base a estos resultados se decidió utilizar una concentración de 0,1μM para cada uno de los genes *tet* (A, B, C y M) en los posteriores pasos de optimización de la reacción de PCR.

4.2.5.-Optimización de la temperatura de *annealing*

Al analizar el comportamiento de los *primers* a diferentes temperaturas, se demostró que todos tuvieron un buen desempeño en el rango de temperatura empleado (Fig. 7)

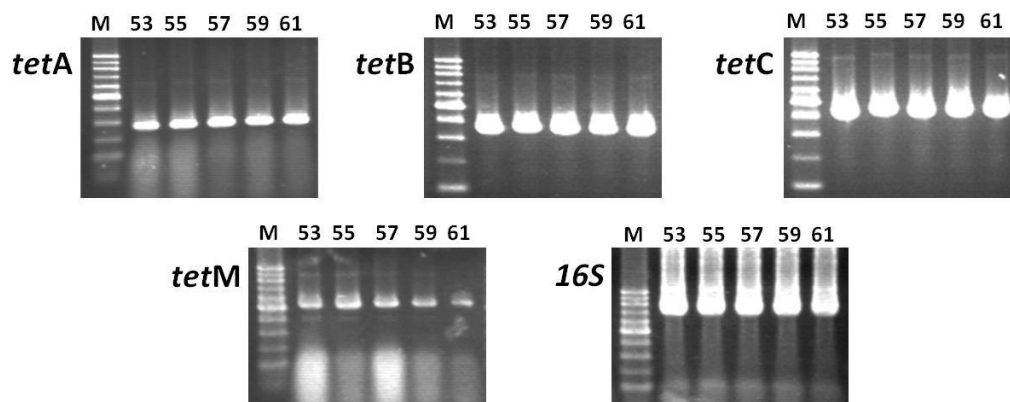


Figura 7: Amplificación de cada uno de los genes con distintas temperaturas de *annealing* (53, 55, 57, 59 y 61 °C)

Sin embargo, pudo apreciarse una leve disminución en la amplificación del gen *tetM* a las temperaturas de 59 y 61°C. Por este motivo se seleccionó 57°C como la temperatura óptima para el *annealing*.

4.2.6.-Optimización del número de ciclos

Al analizar la cantidad de ADN amplificado en cada una de las reacciones de PCR, medido como Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) en función del número de ciclos (Fig. 8), puede apreciarse claramente que la reacción de amplificación para el gen *rna16S* tiene un comportamiento muy distinto al de los demás genes amplificados. En este caso la amplificación, detectable, comienza alrededor de los ciclos 13-14. Esto, posiblemente se debe a que existen múltiples copias de este gen en el cromosoma de *Escherichia coli*, mientras que los otros genes son de copia única o muy bajo número de copias.

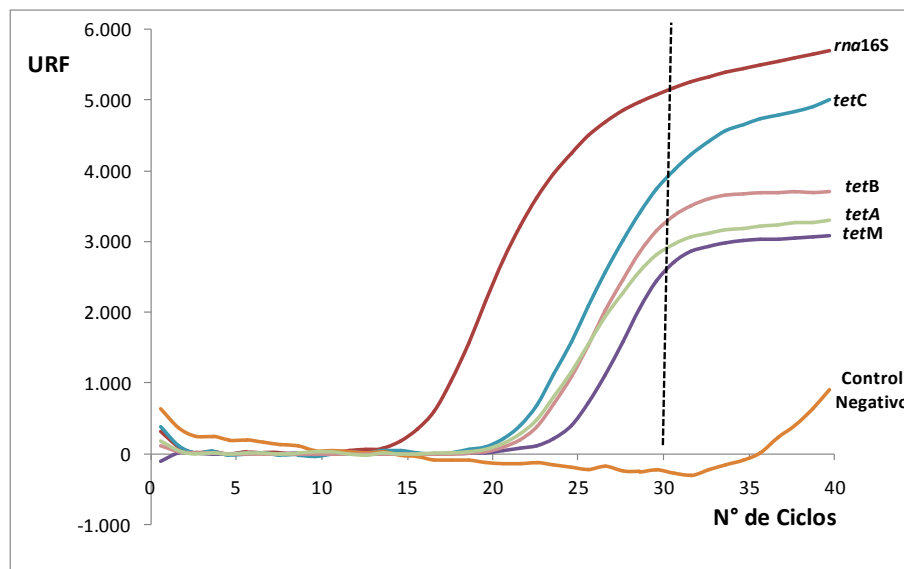


Figura 8: Amplificación en tiempo real de cada uno de los genes. Cuantificado como Unidades Relativas de fluorescencia (URF) en función del número de ciclos.

En los demás casos, la amplificación comienza alrededor del ciclo número 20 y continúan amplificándose exponencialmente hasta aproximadamente el ciclo 30. En el caso de los genes *tetA*, *tetB* y *tetM* se observó que luego del ciclo 30 la amplificación se detiene y entran en una fase de meseta, comúnmente denominada *plateau*, mientras que la amplificación de los genes *rna16S* y *tetC* continúa aumentando hasta el ciclo 40, aunque ya no de manera exponencial; esto podría deberse a la formación de productos inespecíficos hacia el final de la reacción de PCR.

Por otro lado, se observó una amplificación en el control negativo, formado por una combinación de todos los *primers* que se utilizaran en la mPCR, en ausencia de molde, luego del ciclo 35, lo cual indicaría la formación de dímeros entre algunos de los *primers*.

En vista de estos resultados, se fijó en 30 el número óptimo de ciclos. Así mismo, en este punto, también se decidió disminuir aún más la concentración de los *primers* a utilizar en la amplificación del gen *rna16S*, a 0,05 μ M, para evitar un efecto de competencia por la Taq polimerasa y los dNTPs, entre el producto del gen 16S y los demás productos a amplificar durante la reacción de PCR múltiple.

4.2.7.-PCR múltiple

Para confirmar el desempeño de la mPCR, se realizaron reacciones de amplificación a partir de distintas cepas de *Escherichia coli* conteniendo cada uno de los genes de resistencia a detectar en este trabajo. En cada uno de los casos pudo observarse la presencia de la banda específica para los genes *tet A*, *B*, *C* y *M*; con 283, 376, 446 y 588 pb respectivamente, y una banda adicional de 819 bp correspondiente al gen *rna16S*, que funciona como control interno de amplificación. Por otro lado, al utilizar como molde el ADN extraído a partir de una cepa de *Escherichia coli* sensible a TET, sólo pudo observarse la banda perteneciente al control interno de amplificación (Fig. 9 calle 5). En ninguno de los casos se observó la formación de dímeros de *primers*, ni siquiera en el control negativo, en el que se utilizó agua destilada en lugar de molde y en este caso la formación de dímeros se hubiera visto favorecida.

Además, al utilizar como molde una combinación de todos los genes de resistencia, se logró la amplificación simultánea de todos ellos (Fig. 9 calle 7) lo que confirma que este protocolo de mPCR, puede ser utilizado para detectar la presencia de más de un gen de resistencia en una misma bacteria.

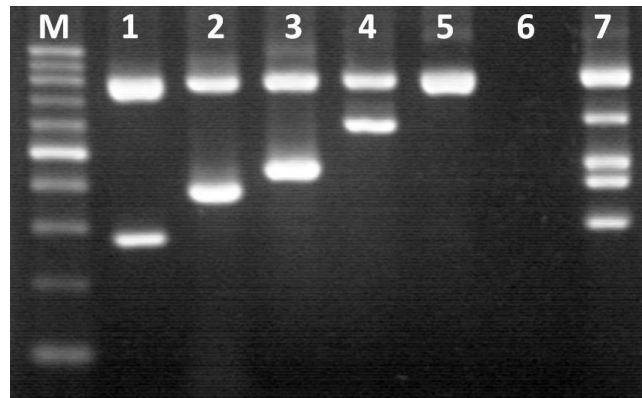


Figura 9: Amplificación por mPCR de cada uno de los genes de resistencia a TET. 1: *tetA*; 2: *tetB*; 3: *tetC*; 4: *tetM*; 5: ADN de una cepa de *Escherichia coli* sensible a TET; 6: control negativo (agua en lugar de molde); 7: Control positivo (formado por una combinación de todos los genes de resistencia. M: marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder - Biodynamics)

4.3.-ANÁLISIS GENÉTICO DE MUESTRAS DE CAMPO

4.3.1.- Determinación genotípica de la resistencia a tetraciclina

Una vez optimizada la mPCR, se procesaron un total de 168 muestras de *Escherichia coli* con sensibilidad disminuida a TET, pertenecientes a la población NWT (ver sección 3.3.1), de las cuales 86 muestras (51.2%) fueron positivas para el gen *tetA*, 83 (49.4%) para *tetB* y 13 muestras fueron positivas para *tetM* (7.7%) (Tabla 9). En ninguna de las muestras analizadas se encontró la presencia del gen *tetC*. Al analizar un trabajo de Chalmers y col., donde todos los aislamientos positivos a *tetC* tenían CIM a TET agrupadas en torno a un rango de sensibilidad intermedia de 2 a 16 $\mu\text{g} / \text{ml}$, decidimos analizar una cepa con CIM de 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y otra con CIM de 16 $\mu\text{g} / \text{ml}$, ambas de origen aviar, en donde tampoco hallamos el gen *tetC*; pero en su defecto hallamos el gen *tetA* y el gen *tetM* respectivamente.

Tabla 9: Frecuencia de los genes de resistencia a TET en *Escherichia coli* por especie animal y por periodo

Especie	<i>n</i>	Periodo	<i>tetA</i> (%)	<i>tetB</i> (%)	<i>tetM</i> (%)
Aves	30	2006-08	21(70)	7 (20)	4(13.3)
	39	2010-12	30(76.9)	14(35.8)	2(5.1)
Cerdos	36	2006-08	13(36.1)	24(66.6)	
	40	2010-12	10(27.7)	32(88.8)	6(16.6)
Bovinos	3	2006-08	1(33.3)	2(66.6)	
	20	2010-12	11(55)	12(60)	

En algunos casos, incluso, se detectó la presencia de dos genes de resistencia en una misma cepa, siendo la asociación *tetA* y *tetB* la de mayor aparición, 13 veces (7.7%). La presencia simultánea de los genes *tetB* y *tetM* se observó en 7 casos (4.2%); mientras que la asociación *tetA* y *tetM* sólo se encontró en dos de las muestras analizadas (1.2%) (Figura 10, Tabla 10).

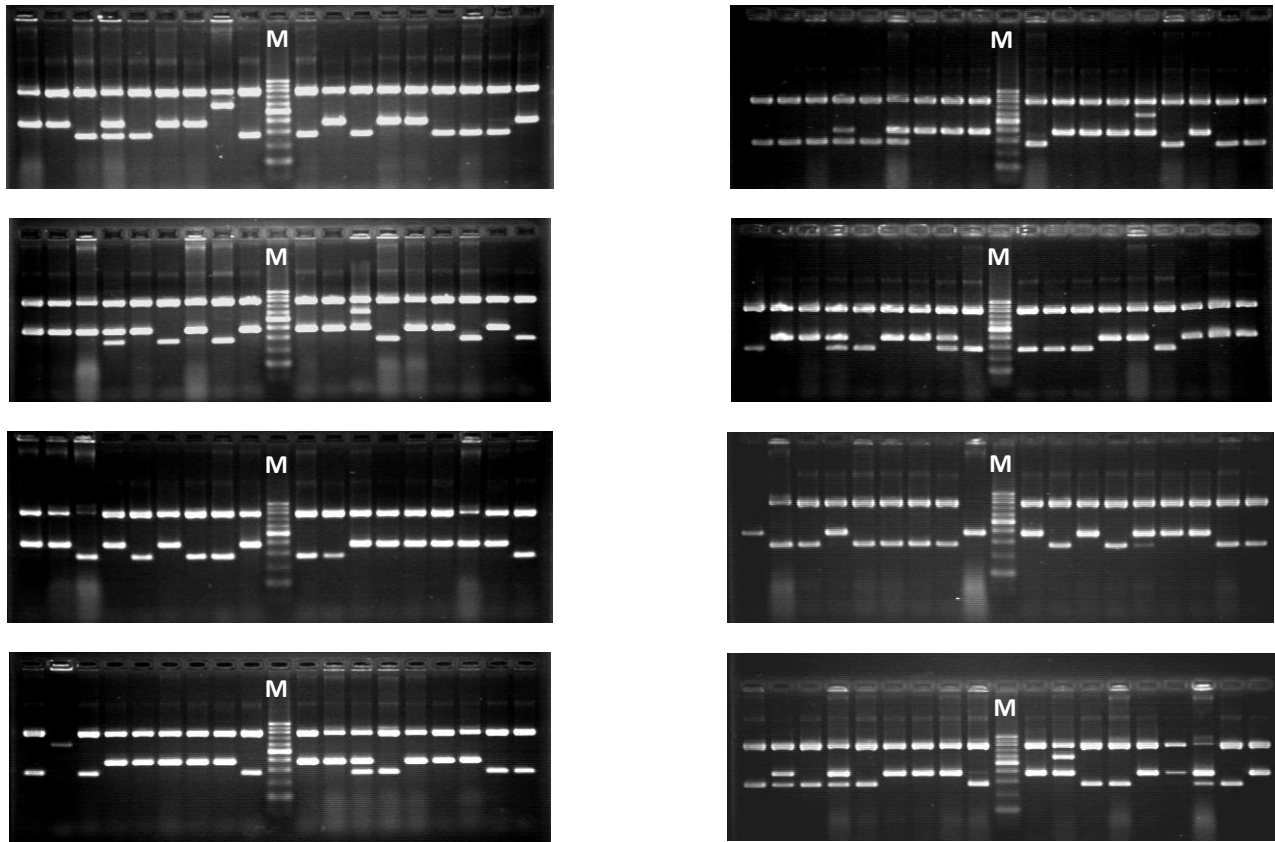


Figura10: Ejemplo de algunas corridas de la amplificación por mPCR de los aislamientos de *Escherichia coli* de la población NWT. M: marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder - Biodynamics)

Tabla 10: Frecuencia de la asociación de los genes de resistencia a TET en *Escherichia coli* por especie animal y por periodo

Especie	<i>n</i>	Periodo	<i>tetA+B</i> (%)	<i>tetA+M</i> (%)	<i>tetB+M</i> (%)
Aves	30	2006-08		1(3.3)	1(3.3)
	39	2010-12	7(18)		1(2.5)
Cerdos	36	2006-08	1(2.7)		
	40	2010-12	2(5)	1(2.5)	5(12.5)
Bovinos	3	2006-08			
	20	2010-12	3(15)		

En la mayoría de los casos pudo observarse la correcta amplificación del gen *rna16S*, utilizado tanto como control de extracción y como control interno de amplificación, sin embargo, hubo algunas muestras en las que no se detectó la amplificación de dicho gen, posiblemente debido a un inconveniente durante la extracción. Todas las muestras en las que no se amplificó el control interno fueron repetidas, incluso en los casos en los que sí aparecían bandas correspondientes a los marcadores de resistencia buscados.

4.3.2.- Determinación de la presencia de marcadores de resistencia en plásmidos

La presencia de al menos un plásmido pudo observarse en 58 cepas de *Escherichia coli* del total de las 168 (34.5%) muestras analizadas, 26 correspondientes a muestras de aves, 25 de porcinos y 7 de bovinos. La mayoría de las bacterias analizadas contenían más de un plásmido como puede verse en la figura 11.

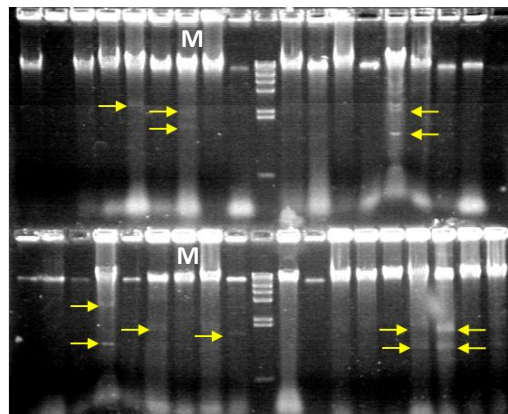


Figura 11: Ejemplo de la corrida electroforética y la visualización de plásmidos en geles de agarosa. **M:** Marcador de peso molecular λ HindIII (Promega)

Todas las muestras en las que se visualizó la presencia de plásmidos fueron posteriormente utilizadas para transformar por shock térmico una cepa de *Escherichia coli* K12 químicamente competente. De las 58 muestras analizadas, luego de la transformación, sólo 8 de ellas lograron crecer

en un medio conteniendo TET, demostrando de esta manera que esos plásmidos poseían un gen de resistencia.

Al analizar las bacterias transformadas por mPCR, se confirmó la presencia y la identidad de los genes asociados a la resistencia (Figura 12).

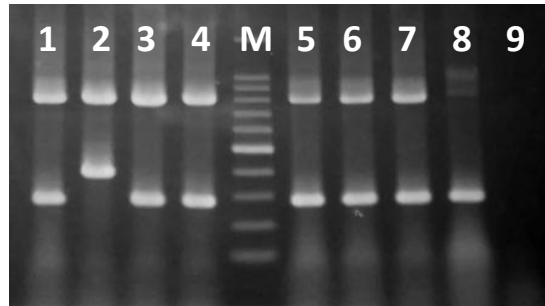


Figura 12: mPCR de las bacterias transformadas que adquirieron resistencia a tetraciclina. **1-8:** muestras analizadas por mPCR, **9:** Control negativo. **M:** marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder - Biodynamics)

En este caso 7 de las bacterias analizadas contenían un gen de resistencia del tipo *tetA* y la restante *tetB*; distribuidas, el gen *tetA* en tres cepas de origen aviar, dos de origen porcino y dos de origen bovino y el gen *tetB* en una cepa de origen porcino.

En la tabla 11 pueden observarse los datos de la presencia de marcadores de resistencia en plásmidos y en el Anexo II los datos fenotípicos, genotípicos, presencia y caracterización de genes de resistencia a TET en plásmidos, en las tres especies animales estudiadas y en los dos periodos de muestreo.

Tabla 11: Frecuencia de la presencia de plásmidos y de genes de resistencia a TET en *Escherichia coli* por especie animal y por periodo

Especie	<i>n</i>	Periodo	Plásmidos (%)	Genes de R	Caracterización
Aves	30	2006-08	9 (30)	1 (11.11)	<i>tetA</i>
	39	2010-12	17 (43.59)	2 (11.76)	<i>tetA</i>
Porcinos	36	2006-08	12 (33.3)	1 (2.7)	<i>tetB</i>
	40	2010-12	13 (32.5)	2 (5)	<i>tetA</i>
Bovinos	3	2006-08	0 (100)	0	
	20	2010-12	7 (35)	2 (10)	<i>tetA</i>

5.-DISCUSIÓN

5.1- RESISTENCIA FENOTÍPICA

Los trabajos seleccionados, para la comparación de resultados de la resistencia fenotípica con este estudio, fueron aquellos en los que se consideró la resistencia microbiológica utilizando valores de corte epidemiológico, WCV, ECOFF o ECV, es decir, cepas con sensibilidad disminuida o reducida a TET utilizando el método de CIM y considerando la población NWT.

5.1.1- Resistencia fenotípica en pollos parrilleros

En el año 2004, en un estudio en Estados Unidos de América (Bryan y col., 2004), hallaron un 47% de resistencia a TET en 151 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pollos parrilleros, donde el punto de corte a TET fue menor de 10 µg/ml. En el año 2016, veintisiete estados miembros (EM) de la Comunidad Europa más Noruega informaron datos cuantitativos sobre la RAM en *Escherichia coli* aislados de las poblaciones de aves de corral y la carne derivada de los mismos. La mayoría de los datos se relacionaron con aislamientos de pollos y pavos de engorde. Con respecto a los pollos de engorde, los niveles de resistencia general a TET fueron de los más altos observados, con 50.1% de resistencia en 5043 cepas estudiadas. Hubo una variación sustancial en el nivel de resistencia a TET entre los EM; los valores hallados en Dinamarca, Finlandia y Suecia fueron menores al 10%, en Alemania, Austria, Eslovenia, Estonia, República Checa fueron entre 18 y 34%, en Bélgica, Croacia, Hungría, Irlanda, Letonia, Malta, Países Bajos, Eslovaquia, España y Reino Unido los valores fueron entre un 40 y 60% y en Bulgaria, Chipre, Francia, Grecia, Italia, Polonia, Portugal y Rumania los valores hallados fueron entre 60 y 96.5%. Los países reportaron principalmente una resistencia relativamente estable en cepas de *Escherichia coli* de *Gallus gallus* entre los años 2008 y 2014. Sin embargo, se identificaron más frecuentemente, aumentos en las tendencias de resistencia a todos los ATM probados, que la disminución de la misma (EFSA, 2016).

En nuestro estudio, los datos hallados en los niveles de sensibilidad reducida a TET en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pollos en el periodo 2006-2008 fueron del 63.8% mientras que en el periodo 2010-2012 se halló un 81%, coincidiendo con los datos de Bulgaria, Chipre, Francia, Grecia, Italia, Polonia, Portugal y Rumania.

5.1.2- Resistencia fenotípica en porcinos

En el estudio de Bryan y col., en 2004, citado anteriormente, hallaron un 78% de resistencia a TET en 182 cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos. Österberg y col. en 2016, en un estudio de cerdos de engorde en explotación convencional en cuatro países europeos, encontraron un 14.1% en Suecia ($n=71$), 42.3% en Dinamarca ($n=52$), 74.4% en Italia ($n=125$), y 74.5% en Francia ($n=94$) de resistencia a TET.

En el año 2017, EFSA informó los resultados hallados en estudios llevados a cabo en el año 2015 en *Escherichia coli* aisladas de cerdos de engorde, de veintisiete de los EM de la Comunidad Europa más Noruega y Suiza. La aparición de resistencia a TET en *Escherichia coli* varió notablemente entre los países participantes. La resistencia general a TET fue de 54.7% en un total de 4268 cepas, con la excepción de Finlandia, Noruega y Suecia que registraron la menor incidencia de resistencia con valores entre 10 y 20%; Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, Estonia, Letonia, Países Bajos, Polonia, República Checa y Suiza con valores entre 20 y 50% y Bulgaria, Croacia, Chipre, España, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Lituania, Malta, Portugal, Reino Unido y Rumania con valores entre 50 y 100%. Además, durante el período de estudio de 7 años entre 2009 a 2015 también se observaron marcadas diferencias entre los países informantes. Analizando la tendencia temporal en la resistencia a TET, se observaron los niveles más altos de resistencia, con

excepción de Austria, Bélgica, Francia y los Países Bajos donde se observaron tendencias decrecientes estadísticamente significativas. (EFSA, 2017)

En nuestro estudio, los datos hallados en los niveles de sensibilidad reducida a TET en cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos en el periodo 2006-2008 fueron del 87.8%, mientras que en el periodo 2010-2012 fueron del 98.1%, coincidiendo con los datos de Bulgaria, Croacia, Chipre, España, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Lituania, Malta, Portugal, Reino Unido y Rumania.

5.1.3- Resistencia fenotípica en bovinos

La inclusión de terneros de menos de un año de edad es de monitorización obligatoria en los EM de la Comunidad Europea. Ha sido reconocido por muchos años que los animales jóvenes y los que se mantienen en EI tienden a mostrar mayores niveles de resistencia que los animales maduros o animales de EE, en relación con las diferencias en su relativa exposición a ATM, incluida la exposición histórica (Hinton, 1986).

Los datos del año 2015 en diez EM de la Comunidad Europea más Noruega y Suiza, sobre la resistencia total a las TET en *E. coli* aisladas de terneros de menos de un año de edad, tuvieron un valor del 45,4% en 1734 cepas aisladas. Los niveles más altos de sensibilidad total fueron hallados en aislamientos de los países nórdicos Dinamarca, Noruega y Suecia, con valores entre 1.4 y 9%. En Alemania, Croacia, Países Bajos, Portugal y Suiza los valores se encontraban entre el 30 y 40% de resistencia y en Bélgica, Francia, Italia y España los valores oscilaban entre el 53 y 71.6% (EFSA, 2017).

En nuestro estudio, los datos hallados en los niveles de sensibilidad reducida a TET en cepas de *Escherichia coli* aisladas de bovinos en el periodo 2006-2008 fueron del 6.9%, coincidiendo con los

países nórdicos; mientras que en el periodo 2010-2012 se halló un 5% en animales de EE y un 41,6% en animales de EI, coincidiendo este último valor con el del resultado general del estudio comparado.

Los aumentos en las tendencias de la resistencia a TET considerando diferentes periodos y en la EI de las tres especies animales estudiadas, coinciden con lo publicado por EFSA en 2016 y 2017.

5.2-RESISTENCIA GENOTÍPICA

Comparando nuestros datos con los hallados por diferentes autores sobre los determinantes genotípicos de resistencia a TET en *Escherichia coli*, en las tres especies animales estudiadas, encontramos resultados similares, en los que genes *tetA* y/o *tetB*, que codifican mecanismos de eflujo, son los determinantes de resistencia a TET más comunes en cepas de *Escherichia coli* de humanos y animales en muchos países (Karami y col., 2006; Tuckman y col., 2007; Amhed y col., 2010; Schwaiger y col., 2010; Hu y col., 2013).

5.2.1- Resistencia genotípica en pollos parrilleros

Entre los años 1997 y 1999, los datos obtenidos en un muestreo en Dinamarca, realizado por el Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP), sobre 17 cepas de *Escherichia coli* no patógenas aisladas de pollos de engorde, donde se examinó la presencia de genes que codifican resistencia a TET, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* y *tetE*, fueron los siguientes: *tetA* 41.2%, *tetB* 52.9% y *tetD* 5.9% (Sengeløv y col, 2003). En el año 2004, en Estados Unidos de América, Bryan y col, publicaron datos sobre el estudio genotípico de 14 genes de resistencia a TET en 66 cepas de *Escherichia coli* resistentes a TET aisladas de pollos, hallando alrededor del 53% de *tetA*, 40% de *tetB*, 5% de *tetC* y 2% de *tetM*. Obeng y col., en un estudio realizado en el sur de Australia entre diciembre de 2008 a junio de 2009, estudiaron los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* y *tetE*, en 39 cepas

de *Escherichia coli* fenotípicamente resistentes a TET aisladas de pollos parrilleros de EI. Los resultados arrojaron la presencia de los determinantes *tetA*, *tetB* y *tetC*, este último sólo combinado, siendo los porcentajes hallados para *tetA* de 64.1%, para *tetB* 7.7%, para *tetA + tetB* 2.5%, *tetA + tetC* 17.9% y *tetB + tetC* 2.5%.

En el Norte de China en el año 2012, en un muestreo de 5 provincias, donde se analizaron los genes *tetA*, *tetB*, *tetC* y *tetM* a 164 *Escherichia coli* resistentes a TET, no se encontró ningún gen de resistencia estudiado en el 17.68% de los aislamientos, siendo la tasa total de prevalencia más alta la del gen *tetA* con 57.9% (95/164) seguida de un 38.4% (63/164) del *tetB* y un 18% del *tetM*. El gen *tetC* no se encontró en ningún aislamiento. Los datos hallados de los genes *tetA*, *tetB* y *tetM* individualmente fueron de 37.8%, 17.07% y 4.28% respectivamente y la combinación de *tetA + tetB* fue 16.46%, *tetA + tetM* 1.83%, *tetB + tetM* 3.05% y *tetA + tetB + tetM* del 1.83% (Zhang y col., 2012).

En Camboya, en un muestreo en pollos parrilleros durante 2012-2013, sobre un total de 520 cepas de *Escherichia coli* TET resistentes se hallaron, valores de *tetA* 86%, *tetB* 7%, *tetA + tetB* 2% y un 5% de genes de resistencia desconocidos (Vuthy y col., 2017).

En Irán, en un estudio genotípico de 40 cepas de *Escherichia coli* resistentes a TET aisladas de pollos parrilleros un día previo al sacrificio, en donde se estudiaron los genes *tetA*, *tetM*, *tetO* y *tetS*, se hallaron un 72.5% de *tetA*; ninguna de las cepas estudiadas contenía los genes *tetM*, *tetO* y *tetS* (Zibandeh y col., 2016).

En nuestro estudio genotípico, los resultados hallados en *Escherichia coli* aisladas de aves sobre 30 cepas en el período 2006-2008 fueron los siguientes: *tetA* 70%, *tetB* 20% y *tetM* 13.3%; de las cuales 1 cepa poseía la asociación *tetA + tetM* (3.3%) y otra cepa la asociación *tetB + tetM* (3.3%). En el período 2010-2012, sobre 39 cepas, hallamos *tetA* 76,9%, *tetB* 35.8% y *tetM* 5.1%; de las cuales 7

cepas poseían la asociación *tetA + tetB* 7(18%) y 1 cepa (2.5 %) la asociación *tetB + tetM*. El determinante de resistencia más comúnmente hallado es *tetA*, 70 y 76,9%, respectivamente a cada periodo, donde una de las cepas aparece asociada con *tetM* en el primer periodo y 7 cepas asociadas con *tetB* en el segundo periodo; seguido de *tetB* con 20% y 35.8% de aparición en cada periodo, donde una cepa aparece asociada con *tetM* en cada periodo y el *tetM* con 13.3 y 5.1% de prevalencia según periodo. Nuestros resultados coinciden con los de Obeng y col., Zhang y col. y Vuthy y col. en los cuales se encontró mayor frecuencia del gen *tetA*.

5.2.2- Resistencia genotípica en porcinos

En Dinamarca, en el estudio publicado por Sengeløv y col. en 2003, sobre un total de 19 *Escherichia coli* no patógenas resistente a TET aisladas de cerdos, se halló un 73.7% a *tetA*, un 21.1% a *tetB* y un 5.3% no identificado.

En el año 2004, en el estudio de Bryan y col., donde se analizaron 14 genes, en 131 cepas resistentes a TET aisladas de cerdos hallaron alrededor del 30% del gen *tetA*, 60% de *tetB*, 6% de *tetC* y 4% de *tetM*. En Alemania, Schwaiger y col. en el año 2010, en un trabajo sobre detección de los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetM*, *tetK*, *tetL*, *tetO*, *tetS*, *tetW* y *tetZ*, en 137 cepas resistentes a TET de *Escherichia coli* aisladas de cerdos, hallaron 51.8% para el gen *tetA*, 33.6% para *tetB*, 2.2% para *tetC*, además de 1.5% para la combinación *tetA + tetB*, 1.5% para *tetA + tetC*, 2.2% para *tetA + tetD*, 1.5% para *tetB + tetM*, 1.5% para *tetB + tetC*, 0.7% para *tetA + tetM* y *tetB + tetD + tetM*. No se detectaron los genes *tetK*, *tetL*, *tetO*, *tetS*, *tetW* y *tetZ* en ninguna de las muestras estudiadas y en el 2.9% no se detectó ningún gen que codifica la resistencia a TET.

En Polonia, en el año 2014 Mazurek y col., publicaron un trabajo en el cual estudiaron los genes de resistencia *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* y *tetM* en 172 cepas resistentes a TET de *Escherichia coli* aisladas

de cerdos. Los datos encontrados fueron para *tetA* 54.6%, para *tetB* 18%, para *tetC* 13.9% y las combinaciones de *tetA + tetB* 6.9% y *tetA + tetC* del 6.3%.

En Bulgaria, Urumova, entre diciembre de 2013 y mayo de 2014, estudió los determinantes *tetA* y *tetB* en 29 cepas de cerdos resistentes a TET hallando un 80.7% de *tetA* y un 7.6% de *tetB*, sin detectar en las 6 cepas restantes ninguno de estos determinantes.

Los resultados de nuestro estudio genotípico de las cepas porcinas fueron los siguientes: sobre 36 cepas en el período 2006-2008 hallamos *tetA* en el 36.1%, *tetB* en el 66.6%; de las cuales una cepa (2.7 %) poseía la combinación *tetA +tetB*. En el período 2010-2012 sobre 40 cepas, la frecuencia de aparición fue de *tetA* 27.7%, *tetB* 88.8% y *tetM* 16.6%, de las cuales 2 cepas poseían la combinación *tetA +tetB* (5%), 1 cepa poseía la *tetA +tetM* (2.5%) y 5 cepas la combinación *tetB + tetM* (12.5%).

Así, en nuestro estudio, la mayor prevalencia es la del determinante *tetB*, 66.6% y 88.8% según periodo, coincidiendo con la prevalencia de este determinante hallada por Bryan y col.

Los aislamientos de *Escherichia coli* de aves y pollos fueron las únicas cepas que contenían *tetM* y en general tenían más de un determinante de resistencia a TET por cepa, coincidiendo con los datos hallados por Bryan y col.

5.2.3- Resistencia genotípica en bovinos

En Dinamarca, en el mismo estudio publicado por Sengeløv y col. en 2003, sobre un total de 9 *Escherichia coli* no patógenas resistente a TET aisladas de bovinos, se halló *tetA* en el 77.8% y *tetB* en el 22.2%.

Shin y col., en Corea del Norte, en un muestreo de bovinos clínicamente sanos realizado entre los años 2011 y 2012, estudiaron los genes de resistencia *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* y *tetG* a 155 cepas

aisladas de *Escherichia coli* resistentes a TET. Las prevalencias de *tetA* y *tetB* fueron prácticamente iguales, de 46.5% y 45.1%, respectivamente, *tetC* 7.1%, *tetA + tetB* 1.3% y *tetB+ tetC* 1.3%.

Los resultados en bovinos, en nuestro estudio fueron los siguientes: en el período 2006-2008 sobre 3 cepas, hallamos *tetA* 33.3% y *tetB* 66.6% y en el período 2010-2012 sobre 20 cepas, hallamos *tetA* 55% y *tetB* 60%; de las cuales tres cepas poseían la combinación *tetA + tetB*, 15%. Nuestros resultados coinciden con los de Mirzaagha y col., y con los de Gow y col., en los que el determinante *tetB* es el dominante en esta especie animal. En contraposición, en estudios previos realizados por otros autores en ganado bovino de carne, el determinante *tetA* fue dominante en aislamientos de *Escherichia coli* (Karczmarczyky col., 2001; Sharma y col., 2008).

5.3- SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA FENOTÍPICA Y GENES DE RESISTENCIA ASOCIADOS

Si bien hay varias publicaciones donde se asocian los valores de la CIM con la presencia de determinados genes de resistencia, en nuestro estudio no es posible determinarlo ya que las cepas incluidas en el mismo tienen valores de CIM entre 32 y 64 mg/l, siendo esta última la menor dilución realizada (Blake y col. 2003; Tuckman y col., 2007; Gow y col., 2008; Shin y col., 2015). Además, según Gow y col., los genotipos no siempre se corresponden con la expresión fenotípica en aislamientos individuales. En su estudio tres aislamientos poseían genes de resistencia a TET, pero no tenían evidencia de resistencia fenotípica, coincidiendo con nuestro estudio donde dos cepas de origen aviar fenotípicamente pertenecientes a la población WT poseían genes de resistencia, una de ellas el gen *tetA* y la otra el gen *tetM*. Por el contrario, en el estudio de Gow y col., también hubo aislamientos que se clasificaron como resistentes en función de las CIM, pero no tenían genes de resistencia identificados.

Varios estudios han descrito cepas de *Escherichia coli* que llevan dos o más genes *tet*. Los datos de alrededor del 20 % de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de pollos parrilleros y alrededor del 30 % de las cepas aisladas de porcinos hallados por Bryan y col., son datos similares a los hallados en nuestro estudio en el periodo 2010-2012, en el cual el 20.5% de las cepas de pollos parrilleros, el 20% de las cepas aisladas de cerdos y el 15% de las cepas aisladas de bovinos poseían dos genes de resistencia asociados. Por otro lado, en el estudio de Sengeløv y col., sobre 100 cepas de *Escherichia coli* resistentes a TET aisladas de pollos parrilleros, cerdos y bovinos sólo el 2% de las mismas poseían dos genes de resistencia asociados, con datos similares a los hallados en el periodo 2006-2008 de nuestro estudio en donde el 6.6% de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de pollos parrilleros y el 2.7% de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de porcinos y bovinos poseían dos genes de resistencia asociados.

Según Bryan y col. y Shin y col., la presencia de más de un determinante de resistencia no conduce a valores de CIM notablemente más altos. Así, en nuestro estudio dos cepas de origen bovino con asociación de genes *tetA* y *tetB* poseen una CIM de 32 µg/ml. Es posible que las fuertes presiones de selección proporcionadas por los ambientes que contienen niveles elevados de TET, conduzcan a la adquisición de más de un gen de resistencia en una cepa dada debido a su prevalencia en el ambiente, en lugar de una ventaja selectiva.

5.4.-MARCADORES DE RESISTENCIA EN PLÁSMIDOS

La transferencia conjugativa es el mecanismo más común para la entrega de RAM entre bacterias Gram-negativas debido a que la conjugación del plásmido puede ocurrir a una alta frecuencia (Sunde y Norstrom, 2006).

Los genes *tet* se encuentran en una variedad de bacterias aisladas del hombre, animales y medio ambiente. La mayoría de estos determinantes se ubican en el cromosoma o en plásmidos conjugativos o no conjugativos y muchos de ellos están asociados con transposones conjugativos o no conjugativos que luego pueden localizarse en plásmidos o en el cromosoma. (Roberts, 1994). La naturaleza móvil de muchos genes de resistencia a TET puede explicar en parte su amplia distribución entre diferentes especies bacterianas. (Roberts, 1996). Además, los plásmidos de las bacterias Gram-negativas a menudo llevan varios determinantes de resistencia a ATM confiriendo así el fenotipo de MDR. Por estudios de conjugación de estos plásmidos se ha observado que los genes de resistencia se transmiten como un cluster y se localizan en integrones, elementos genéticos capaces de capturar y diseminar estos genes, confiriendo así resistencia a los ATM, especialmente en bacterias Gram-negativas (Tosini y col., 1998).

La transferencia por transformación es el proceso mediante el cual las bacterias atrapan ADN libre, algunas de ellas son transformables naturalmente. Aunque este mecanismo juega un papel importante en el ambiente no es tan común como la conjugación (Wolska, 2003). Según Hanahan, las células individuales son capaces de absorber muchas moléculas de ADN, y la presencia de plásmidos múltiples no afecta significativamente la ocurrencia de eventos de transformación exitosos (Hanahan, 1983). Además, varios factores pueden afectar la eficiencia de la transformación, entre ellos el tamaño del plásmido, un estudio realizado en *Escherichia coli* encontró que la eficacia de la transformación disminuye linealmente con el aumento del tamaño del plásmido; las formas de ADN, el plásmido superenrollado tiene una eficacia de transformación ligeramente mayor que los plásmidos relajados y el ADN lineal y monocatenario tiene una eficacia de transformación mucho menor que los de doble cadena (Hanahan y col., 1991).

Si bien, no hay muchos trabajos previos en los que se ha estudiado la presencia de genes de resistencia en plásmidos por el mecanismo de transformación, existen algunos en donde se los ha estudiado por el de conjugación.

Aunque se supone que la transferencia horizontal de los genes TET proporciona un mecanismo efectivo para la distribución generalizada de resistencia a este ATM en poblaciones bacterianas y explica la alta prevalencia de aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a TET, en nuestro estudio sólo 8 cepas (4.76%) poseían plásmidos con genes de resistencia a TET.

La muy baja presencia de plásmidos en las cepas analizadas por nosotros, permite suponer que la transferencia de estos genes efectivamente podría ser realizada de forma horizontal por conjugación, pero también involucrar elementos integrativos como transposones o secuencias de inserción que permiten la incorporación de dichos genes dentro del cromosoma bacteriano.

Esperamos que estos hallazgos puedan ser utilizados como datos básicos para estudios epidemiológicos y estudios para evaluar el riesgo de resistencia a TET.

6.-CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los datos hallados en nuestro estudio concluimos que:

- Todas las cepas de *Escherichia coli* resistentes a TET analizadas poseen genes de resistencia a dicho ATM.
- El porcentaje de resistencia fenotípica a TET de *Escherichia coli* aisladas de materia fecal de animales sanos de terminación de las tres especies analizadas es mayor en el segundo periodo estudiado.
- El porcentaje de resistencia fenotípica a TET de *Escherichia coli* aisladas de materia fecal de animales sanos de terminación de las tres especies analizadas es mayor en las tres EI.
- El gen de resistencia *tetC* no se ha detectado en las cepas de *Escherichia coli* analizadas.
- Los genes de resistencia *tetA*, *tetB* y *tetM* están presentes en aves y porcinos, mientras que el gen *tetM* no se ha detectado en bovinos.
- Los genes de resistencia *tetA*, *tetB* y *tetM* según el periodo de tiempo analizado no presenta variaciones a excepción del gen *tetM* que no se ha detectado en el primer periodo estudiado en *Escherichia coli* de origen porcino.
- La presencia de dos genes de resistencia asociados están presentes en las tres especies animales analizadas y en los dos periodos de tiempo.

- Cepas de *Escherichia coli* pertenecientes a la población WT poseen genes de resistencia a TET.
- La presencia de más de un gen de resistencia no incrementa el valor de la CIM.
- La muy baja presencia de plásmidos en las cepas analizadas permite suponer que, la transferencia de estos genes efectivamente podría ser realizada de forma horizontal por conjugación, pero también involucrar elementos integrativos como transposones o secuencias de inserción que permiten la incorporación de dichos genes dentro del cromosoma bacteriano.

7- BIBLIOGRAFÍA

Aarestrup FM, Carstensen B. Effect of tylosin used as a growth promoter on the occurrence of macrolide-resistant enterococci and staphylococci in pigs. *Microb Drug Resist.* 1998; 4 (4): 307–12.

Aarestrup FM, Kruse H, Tast E, Hammerum AM, Jensen LB. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. *Microb Drug Resist.* 2000; 6 (1): 63–70.

Ahmed MO, Clegg PD, Williams NJ, Baptiste KE, Bennett M. Antimicrobial resistance in equine faecal *Escherichia coli* isolates from North West England. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2010; 9:12. [Online] <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-9-12>.

Arnold C. To Share and Share Alike: Bacteria swap genes with their neighbors more frequently than researchers have realized. *Scientific American* 2011; 304: 30 – 31.

[Online] <https://www.nature.com/scientificamerican/journal/v304/n4/pdf/scientificamerican0411-30.pdf>

Atkinson B A, Abu-Al-Jaibat A, LeBlanc D J. Antibiotic resistance among enterococci isolated from clinical specimens between 1953 and 1954. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 1598–1600.

Baquero F, Blázquez J, Martínez JL. Mutación y resistencia a antibióticos. *Investigación y Ciencia.* 2002; 315:72-8.

[Online] <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=284622>

Baquero F. Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:67-73.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7(6):1513-22.

Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia* En: Manual de Microbiología Veterinaria. Ed Vadillo S, Piriz S, Mateos E. Ed McGraw-Hill Interamericana de España 2002, p. 301-25.

Blake DP, Humphry RW, Scott KP, Hillman K, Fenlon DR, Low JC. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. *J Appl Microbiol.* 2003; 94:1087-97. [Online] <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01937.x>.

Basic Local Alignment Search Tool nucleotide (*BLASTn*).

[Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

Boudewijn C, Dewulf J, Maes D, Pardon B, Callens B, Vanrobaeys M, Opsomer G, de Kruif A, Haesebrouck F. Effect of Antimicrobial Consumption and Production Type on Antibacterial Resistance in the Bovine Respiratory and Digestive Tract. *PLoS ONE* 2016; 11(1). [Online] <http://e0146488.doi:10.1371/journal.pone.0146488>

Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, non selected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(4): 2503-7.

Burton GC, Hirsh DC, Blendon DC, Zeigler JL. The effects of tetracycline on the establishment of *Escherichia coli* of animal origin, and in vivo transfer of antibiotic resistance, in the intestinal tract of man. J Appl Microbiol. 1974; 3: 241–53.

Canton R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. Clin Microbiol Infect. 2009; 15:20-5.

Carlioni G, Pereyra A, Denamiel G, Gentilini E. Resistencia a antimicrobianos en aislamientos de *Escherichia coli* de origen animal. In Vet 2011; vol.13 (2):47-51.

[Online] http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982011000200005

Chalmers G, Kozak GK, Hillyer E, Reid-Smith RJ, Boerlin P. Low minimum inhibitory concentrations associated with the tetracycline-resistance gene *tet(C)* in *Escherichia coli*. Can J Vet Res. 2010; 74(2): 145–8.

Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. J Antimicrob Chemother. 1992; 29:245–77.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001; 65:232-60.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th informational supplement, 2006; M 100-S 16. Wayne, Pa, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition. M31-A3, Wayne, Pa, USA. 2008; 28(8).

Clinical and Laboratory Standards Institute. Generation, Presentation, and Application of Antimicrobial Susceptibility Test Data for Bacteria of Animal Origin; A Report, 2011; X08-R. Wayne, Pa, USA.

Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor D E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003a; 47: 3675–81.

Connell SR, Trieber CA, Einfeldt E, Taylor DE, Nierhaus KH. Mechanisms of Tet (O), perturbs the conformation of the ribosomal decoding center. *Mol Microbiol.* 2003b; 45: 1463-72.

Courvalin P. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med.* 2008; 264 (1): 4-16.

D’Costa VM, Griffiths E, Wright GD. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10:481-9.

D’Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011; 477:457-61.

Edwards L. Horizontal gene transfer in microbes much more frequent than previously thought. *PhysOrg* 2010.[Online] <http://phys.org/news205389256.html>

European Food Safety Authority (EFSA).The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. [Online] <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4380>

European Food Safety Authority (EFSA).The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. 2017. [Online] <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4694>

Emborg H Jensen VF, Larsen LS, Struve T, Jensen LB, Seyfarth AM, Agersø Y, Skjøt-Rasmussen L, Jensen US, Olsen SS, Hammerum AM, Sko RL. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. DANMAP 2007. [Online] http://www.food.dtu.dk/~media/Institutter/Foedevareinstituttet/Publikationer/Pub-2007/danmap_2007.ashx

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. [Online] <http://mic.eucast.org>

Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*. 2012; 337:1107-11.

FranklinTJ.Mode of action of the tetracyclines. *Biochemical studies of antimicrobial drugs*. Sixteenth Symposium of the Society for General Microbiology.*Ed*NewtonB. A., Reynolds P. E. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom,1966, p:192– 212.

Gorbach SL. Antimicrobial use in animal feed—time to stop. *N Engl J Med*. 2001; 345:1202–3.

Grasselli E, François P, Gutacker M , Gettler B , Benagli C , Convert M , Boerlin P, Schrenzel J , Piffaretti JC. Evidence of horizontal gene transfer between human and animal commensal *Escherichia coli* strains identified by microarray. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008; 53 (3): 351–8.

Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74:3658–66. [Online] <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02505-07>

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003; 361 (9356): 512–9.

Hanahan D. Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983; 166 (4): 557–80.[Online] [http://doi:10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](http://doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8). PMID 6345791

Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*.1991; 204: 63–113. [Online] [http://doi:10.1016/0076-6879\(91\)04006-a](http://doi:10.1016/0076-6879(91)04006-a). PMID 1943786.

Hinton M. The ecology of *Escherichia coli* in animals including man with particular reference to drug resistance. *Vet Record*. 1986; 119 (17). [Online] <http://dx.doi.org/10.1136/vr.119.17.420>

Hu GZ, Pan YS, Wu H, Hu H, Xu R, Yuan L, Liu JH, Feng JK. Prevalence of tetracycline resistance genes and identification of *tet(M)* in clinical isolates of *Escherichia coli* from sick ducks in China. *J Med Microbiol*. 2013; 62:851– 58. [Online]<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.051896-0>.

Hershberger E, Simona FO, Donabedian SM, Perri M , Bozigar P, Bartlett P, Zervos MJ. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55:127–30.

Howells CH, Joynson D H. Possible role of animal feeding-stuffs in spread of antibiotic-resistant intestinal coliforms. *Lancet.* 1975; 1:156–7.

Iyer A, Barbour E , Azhar E, Qadri I , Chaudhary A, Abuzenadah A, Kumosani T, Damanhour G, Bahijri S, Al-Hejin A , Abdel Nour AM , Harakeh S. Bacteriophages in *Escherichia coli* antimicrobial resistance. *Adv Biosci Biotechnol.* 2013; 4: 469-76.

Jensen BB. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J Anim Feed Sci.* 1998; 7: 45-64, Suppl. 1.

Johansson A, Greko C, Engström BE, Karlsson M. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Vet Microbiol.* 2004; 99: 251–7.

Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, Rodloff A, Steinbakk M, Urbaskova P, Vatopoulos A. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52:145-8.

Kay E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simonet P. In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68 (7): 3345–51.

Karczmarczyk M, Walsh C, Slowey R, Leonard N, Fanning S. Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77:7121-7. [Online] <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00601-11>.

Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE. Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:156-61.

Keen EC. Paradigms of pathogenesis: Targeting the mobile genetic elements of disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 161.

Koonin EV, Makarova KS, Aravind L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55: 709–42.

Kriebel D, Tickner J, Epstein P, Lemons J, Levins R, Loechler EL, Quinn M, Rudel R, Schettler T, Stoto M. The precautionary principle in environmental science. *Environ Health Persp.* 2001; 109(9):871-6.

Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol.* 2003; 91: 73-84.

Lahra MM. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian Regions, 2010. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2012; 36(1):95-100.

Leipe D, Wolf YI, Koonin E V, Aravind L. Classification of and evolution of P-loop GTPase and related ATPases. *J Mol Biol.* 2002; 317: 41–72.

Levy SB, FitzGerald GB, Macone AB. Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N Engl J Med.* 1976; Sep 9; 295(11):583-8.

LevySB, McMurryL, Burdett, CourvalinP, HillenW, RobertsMC, TaylorDE. Nomenclature for tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1373–1374.

Levy S B. The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers. 2nd Edition. Cambridge, MA, Ed Perseus Publishing. *Int Microbiol.* 2002; 5: 155–156. [Online] http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/11066/pdf_39

López AC, De Ortúzar RVM, Alippi AM. Tetracycline and oxytetracycline resistance determinants detected in *Bacillus cereus* strains isolated from honey samples. *Rev Arg Microbiol.* 2008; 40: 231-6.

Marshall BM, Levy SB. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24 (4): 718-33

Mazodier P, Davies J. Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu Rev Genet.* 1991; 25: 147–71.

Mazurek J, Bok E, Pusz P, Stosik M, Baldy-Chudzik K. Phenotypic and genotypic characteristics of antibiotic resistance of comensal *Escherichia coli* isolates from healthy pigs. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2014; 58:211-18.

McGowan C, Fulthorpe R, Wright A, Tiedje JM. Evidence for interspecies gene transfer in the evolution of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid degraders. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64 (10): 4089–92.

Mirzaagha P, Louie M, Sharma R, Yanke LJ, Topp E, McAllister TA. Distribution and characterization of ampicillin- and tetracyclineresistant *Escherichia coli* from feedlot cattle fed subtherapeutic antimicrobials. *BMC Microbiol.* 2011; 11:78. [Online] <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-78>.

Moore PR, Evenson A, Luckey TD, McCoy E, Elvehjem CA, Hart EB. Use of Sulfasuxidine, Streptothricin, and Streptomycin in Nutritional Studies with the Chick. *J Biol Chem.* 1946; 165 (2): 437–41.

Moore IF, Hughes DW, Wright GD. Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX. *Biochemistry.* 2005; 44: 11829–35.

Moredo FA, Vigo GB, Cappuccio JA, Piñeyro P, Perfumo CJ, Giacoboni G.I. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 2007; 39:227- 9.

Naik GA, Bhat LN, Chopade BA, Lynch JM. Transfer of broad-host-range antibiotic resistance plasmids in soil microcosms. *Curr Microbiol.* 1994; 28 (4): 209–15.

NikaidoH, ThanassiDG. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37:1393–9.

Nielsen KM. Barriers to horizontal gene transfer by natural transformation in soil bacteria. APMIS Suppl. 1998; 84: 77–84.

Nonaka L, Satoru S. New Mg²-Dependent Oxytetracycline Resistance Determinant Tet 34 in *Vibrio* Isolates from Marine Fish Intestinal Contents. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(5): 1550–1552.

Obeng AS, Rickard H, Ndi O, Sexton M, Barton M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. Vet Microbiol. 2012 ;154: 305-15.

Office International des Épizooties (OIE). Use of Antimicrobials and Protection of Public Health. 2nd OIE International Conference on Antimicrobial Resistance 2003. OIE guidelines 2001. [Online] http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Conferences_Events/docs/pdf/Es_BSE_WHO-FAO-OIE.pdf

Office International des Épizooties (OIE). International Standards on MicrobiologyResistance. 2003. [Online] <http://www.oie.int/doc/ged/D12196.PDF>

Organisation for Economic Co-operation and development (OECD). Safety Assessment of Transgenic Organisms: OECD Consensus Documents. 2010; 4: 171-4. [Online] <http://www.oecd.org/science/biotrack/safetyassessmentoftransgenicorganismsoecdconsensusdocuments.htm>

Österberg J, Wingstrand A, Nygaard Jensen A, Kerouanton A, Cibin V, Barco L, Denis M, Aabo S, Bengtsson B. Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* from Pigs in Organic and Conventional Farming in Four European Countries. PLoS ONE. 2016; 11(6): e0157049. [Online] <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157049>

Palm GJ, Lederer T, Orth P, Saenger W, Takahashi M, Hillen W, Hinrichs W. Specific binding of divalent metal ions to tetracycline and to the Tet repressor/tetracycline complex. *J Biol Inorg Chem*. 2008; 13: 1097–1110.

Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Rev Arg Microbiol*. 2010; 1 (42): 49-52.

Pantozzi FL, IbarMP, NievasVF, Vigo GV, MoredoFA, GiacoboniGI. Wild-type minimal inhibitory concentration distributions in bacteria of animal origin in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2014; 46 (1): 34-40.

Ridenhour MB, Fletcher HM, Mortensen JE, Daneo-Moore L. A novel tetracycline-resistant determinant, *tet(U)*, is encoded on the plasmid pKQ10 in *Enterococcus faecium*. *Plasmid*. 1996; 35:70–80.

Roberts MC. Epidemiology of tetracycline resistance determinants. *Trends Microbiol*. 1994; 2:353–7.

Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*. 1996; 19:1–24.

Roberts MC. Genetic mobility and distribution of tetracycline resistance determinants. Ciba Found Symp. 1997; 207:206-18; discussion 219-22. [Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9189643>

Roberts MC. Minireview: update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Lett. 2005; 245: 195–203.

Roberts MC. Environmental Macrolide–Lincosamide–Streptogramin and Tetracycline Resistant Bacteria. Front Microbiol. 2011; 2: 40.

Sanchez AR, Rogers III RS, Sheridan PJ. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. Int Dermatol. 2004; 43:709-15.

Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild animal fecal samples, human septage, and surface water. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(3): 1394-1404.

Scheutz F, Strockbine NA. *Escherichia*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. U.S.A. Ed. Springer. 2005, vol.2, p. 764-99.

Schjørring S, Struve C, Krogfelt KA. Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. J Antimicrob Chemother. 2008; 62 (5): 1086–93.

Schjørring S, Krogfelt KA. Assessment of Bacterial Antibiotic Resistance Transfer in the Gut. Int J Microbiol. 2011. [Online] <http://dx.doi.org/10.1155/2011/312956>

Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol.* 1996; 165:359–69.

Schrag, S J, Perrot V, Levin VR. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proc R Soc Lond B Biol Sc.* 1997; 264:1287-91.

Schwaiger K, Hölzel C, Bauer J. Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet Microbiol.* 2010; 142: 329–36.

Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gastra W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol.* 2010; 141: 1-4.

Sengeløv G, Halling-Sørensen B, Aarestrup FM. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* from food animals. *Vet Microbiol.* 2003; 95: 91–101.

Sharma R, Munns K, Alexander T, Entz T, Mirzaagha P, Yanke LJ, Mulvey M, Topp E, McAllister T. Diversity and distribution of commensal fecal *Escherichia coli* bacteria in beef cattle administered selected subtherapeutic antimicrobials in a feedlot setting. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74:6178–86. [Online] <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00704-08>.

Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Beef Cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81; 16: 5560-6.

Simjee S, Silley P, Werling HO, Bywater R. Potential confusion regarding the term 'resistance' in epidemiological surveys. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:228-9.

Smith H W, Crabb W E. The effect of the continuous administration of diets containing low levels of tetracyclines on the incidence of drug-resistant *Bacterium coli* in the faeces of pigs and chickens: the sensitivity of the *Bact. coli* to other chemotherapeutic agents. *Vet Rec.* 1957; 69:24–30.

Speer BS, Bedzyk L, Salyers AA. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J Bacteriol.* 1991; 173(1): 176–83.

Stine O, Johnson J, Keefer-Norris A, Perry K, Tigno J, Qaiyumi S, Stine M, Morris Jr. J. Widespread distribution of tetracycline resistance genes in a confined animal feeding facility. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29:348–52.

Stokestad ELR, Jukes TH. Further observations on the "animal protein factor." *Proc SocExp Biol Med.* 1950; 73:523–8.

Sullivan Å. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1 (2): 101–14.

Sunde M, Norstrom M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58:741–747. [Online]<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl294>.

Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM) 2005. [Online] National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden. [Online]

http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/trycksaker/1/svarm2005.pdf

Szmlolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol.* 2013; 4 (258): 1-13.

Taylor DE, Courvalin P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32:1107–12.

Taylor D E, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:1–5.

Taylor D E, Trieber C A, Trescher G, Bekkering M. Host mutations (*miaA* and *rpsL*) reduce tetracycline resistance mediated by Tet(O) and Tet(M). *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:59–64.

Torres Manrique C. (ed.) 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Academia de Farmacia “Reino de Aragón” Zaragoza. Colegio oficial de Farmacéuticos de Zaragoza. [Online] <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf>

Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, Carattoli A. Class 1 Integron-Borne Multiple-Antibiotic Resistance Carried by IncFI and IncL/M Plasmids in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(12): 3053–8.

Tuckman M, Petersen PJ, Projan SJ. Mutations in the interdomain loop region of the tet(A) tetracycline resistance gene increase efflux of minocycline and glycylcyclines. *Microb Drug Resist.* 2000 Winter; 6(4):277-82.

Tuckman M, Petersen PJ, Howe AYM, Orłowski M, Mullen S, Chan K, Bradford PA, Jones CH. Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:3205–11.

[Online] <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00625-07>.

Urumova V. Investigations on tetracycline resistance in commensal *escherichia coli* isolates from swine. *BJVM.* 2016; 19 (13): 179–88.

[Online] tru.uni-sz.bg/bjvm/BJVM%20September%202016%20p.179-188.pdf

van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 14:327-35.

van den Bogert C, Kroon AM. Tissue distribution and effects on mitochondrial protein synthesis of tetracyclines after prolonged continuous intravenous administration to rats. *Biochem Pharmacol.* 1981; 30:1706–9.

Vigo G, Moredo F, Pantozzi F, Ibar M, Giacoboni G. Sensibilidad antimicrobiana de aislamientos bacterianos de casos clínicos de origen porcino y aviar. *Analecta Vet* 2011; 31 (1): 15-21.

Vuthy Y, Sun Lay K, Seiha H, Kerleguer A, Aidara-Kane A. Antibiotic susceptibility and molecular characterization of resistance genes among *Escherichia coli* and among *Salmonella* subsp. in chicken food chains. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(7): 670–4.

[Online] <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.07.002>

Watanabe T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev.* 1963; 27: 8–115.

Witte W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 16 (Suppl.1):19–24.

Wolska KI. Horizontal DNA transfer between bacteria in the environment. *Acta Microbiol Pol.* 2003; 52(3):233–43.

World Health Organisation (WHO). The Medical Impact of Antimicrobial use in Food Animals. Report of a WHO Meeting, 1997, Berlin, Germany.

[Online] http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64439/1/WHO_EMZ_ZOO_97.4.pdf

World Health Organisation (WHO). The world is running out of antibiotics, WHO report confirms. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/en/>

Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5:175–86.

Wright GD. The antibiotic resistome. *Expert Opin Drug Discov.* 2010; 5:779–88.

Yang W, Moore IF, Koteva KP, Bareich DC, Hughes DW, Wright GD. TetX is a flavin- dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J Biol Chem.* 2004; 279: 52346–52.

Zhang T, Wang CG, Lv JC, Wang RS, Zhong XH. Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian *Escherichia coli* in North China. Poultry Sci. 2012; 91 :2774–7.

Zibandeh S, Sharifiyazdi H, Asasi K, Abdi-Hachesoo B. Investigation of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from broiler chickens during a rearing period in Iran. Vet. Arhiv. 2016; 86: 565-72.

8.- ANEXOS

8.1.- ANEXO I

8.1.1-Protocolo para la extracción de ADN total de *Escherichia coli*

- 1- Repicar una colonia de *Escherichia coli* en 10 ml de caldo Luria Bertani (LB) con 12,5 mg / ml de TET
- 2- Incubar durante 24 horas a 37 ° C con agitación
- 3- Centrifugar 2 ml de cada cultivo bacteriano a 13.000 g durante 2 minutos
- 4- Descartar el sobrenadante
- 5- Resuspender el pellet bacteriano, con pipeta, en 1 ml de DNAzol (Thermo Fisher).
- 6- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- 7- Centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos
- 8- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio descartando el pellet
- 9- Agregar 500 µl de Etanol absoluto
- 10- Mezclar por inversión e incubar 3 minutos a temperatura ambiente
- 11- Centrifugar a 4.000 g por 2 minutos
- 12- Descartar el sobrenadante
- 13- Agregar 500 µl de etanol al 75%
- 14- Centrifugar a 4.000 g por 2 minutos
- 15- Repetir los pasos 10 al 12 una vez más
- 16- Descartar todo el sobrenadante
- 17- Dejar secar el pellet con el tubo invertido durante 5 minutos
- 18- Resuspender en pellet en 100 µl de agua libre de nucleasas

Protocolo para la mPCR**Mezcla de primers**

	Volumen	Concentración final
Primer <i>tetA</i> -F (100 μ M)	1 μ l	1 μ M
Primer <i>tetA</i> -R (100 μ M)	1 μ l	1 μ M
Primer <i>tetB</i> -F (100 μ M)	1 μ l	1 μ M
Primer <i>tetB</i> -R (100 μ M)	1 μ l	1 μ M
Primer <i>tetC</i> -F (100 μ M)	1 μ l	1 μ M
Primer <i>tetC</i> -R (100 μ M)	1 μ l	1 μ M
Primer <i>tetM</i> -F (100 μ M)	1 μ l	1 μ M
Primer <i>tetC</i> -R (100 μ M)	1 μ l	1 μ M
Primer 16S-F (100 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
Primer 16S-R (100 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
Agua	91 μ l	-

Mezcla de reacción

	Volumen	Conc. final
2x GoTaq Green Master Mix)	12.5 μ l	1x
Mezcla de primers	2,5 μ l	0,1 μ M*
ADN Molde (~100 ng/ μ l)	2 μ l	~ 8 ng/ μ l
Agua	8 μ l	-

*0.05 μ M para los primers 16S

Para el control negativo se reemplazan los 2 μ l de ADN molde por 2 μ l de agua.

Ciclado

La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando un termociclador XP Cyler (BIOER).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5'	1
94°C	45"	
57°C	45"	30
72°C	1'	
72°C	5'	1

8.1.2- Electroforesis en geles de agarosa

8.1.2.1- Preparación de Buffer TBE

Solución de stock buffet TBE (5x)

En aproximadamente 800 ml de agua desionizada agregar 54 g de Tris-Base, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de una solución 0.5 M de EDTA (pH: 8.0). Ajustar el pH en 8.2 – 8.4, completar el volumen con agua y autoclavar 20 minutos a 121 °C.

Solución de uso buffet TBE (0.5x)

Realizar una dilución 1/10 en agua desionizada a partir de la solución de stock.

Preparación de geles de agarosa (2%)

Mini-geles de 5,4 x 6 cm (8 calles por gel)

Pesar 0.4 g de agarosa D1-LE (Biodynamics), agregar 20 ml de Buffer TBE 0.5x, calentar en microondas hasta disolver completamente la agarosa.

Geles medianos de 11 x 6 cm (17 calles por gel)

Pesar 0.8 g de agarosa D1-LE (Biodynamics), agregar 40 ml de Buffer TBE 0.5x, calentar en microondas hasta disolver completamente la agarosa.

Geles grandes de 14 x 15 cm (38 calles por gel, con dos peines)

Pesar 2 g de agarosa D1-LE (Biodynamics), agregar 100 ml de Buffer TBE 0.5x, calentar en microondas hasta disolver completamente la agarosa.

- Una vez que solidifique la agarosa, colocar el gel en la cuba de electroforesis y agregar buffer TBE 0.5x hasta cubrirlo.

- Sembrar 10 μ l de cada una de las muestras de PCR y 5 μ l del marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder - Biodynamics)
- Realizar la electroforesis a 100 V durante 40 a 50 min (mini-geles o geles medianos) o durante 1 h 30 min para los geles grandes.
- Luego de la electroforesis, retirar el gel de la cuba de electroforesis y sumergirlo en una solución 0,5 mg/ml de bromuro de etidio (SIGMA) durante 15 min.
- Observar los resultados colocando el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

8.2.- ANEXO II

8.2.1.- Datos fenotípicos, genotípicos y presencia y caracterización de genes de resistencia a TET en el periodo 2006-2008.

<i>n</i>	Especie	CIM	<i>TetA</i>	<i>TetB</i>	<i>TetM</i>	Presencia Plásmidos
1	Aviar	≥64	+		+	+
2	Aviar	32			+	
3	Aviar	≥64	+			
4	Aviar	≥64	+			+ (<i>tetA</i>)
5	Aviar	≥64	+			
6	Aviar	≥64	+			+
7	Aviar	≥64		+		
8	Aviar	≥64	+			+
9	Aviar	64	+			+
10	Aviar	64	+			+
11	Aviar	≥64	+			
12	Aviar	64		+		+
13	Aviar	64	+			
14	Aviar	64	+			
15	Aviar	64	+			
16	Aviar	≥64		+		
17	Aviar	64		+		
18	Aviar	32	+			
19	Aviar	32	+			
20	Aviar	≥64		+		
21	Aviar	64	+			
22	Aviar	≥64		+	+	+
23	Aviar	64	+			
24	Aviar	≥64	+			
25	Aviar	32	+			
26	Aviar	64	+			
27	Aviar	64	+			
28	Aviar	64	+			
29	Aviar	≥64	+			
30	Aviar	64			+	+
31	Porcino	≥64		+		
32	Porcino	≥64	+			
33	Porcino	≥64	+			+
34	Porcino	32		+		
35	Porcino	≥64		+		
36	Porcino	32		+		
37	Porcino	≥64		+		
38	Porcino	≥64		+		+
39	Porcino	≥64	+			
40	Porcino	≥64	+			
41	Porcino	64		+		
42	Porcino	≥64	+			
43	Porcino	≥64	+	+		
44	Porcino	≥64		+		
45	Porcino	≥64		+		+
46	Porcino	≥64		+		+
47	Porcino	≥64		+		+ (<i>tetB</i>)
48	Porcino	64		+		

49	Porcino	64	+			
50	Porcino	64	+			
51	Porcino	32	+			
52	Porcino	≥ 64		+		+
53	Porcino	≥ 64		+		
54	Porcino	≥ 64		+		
55	Porcino	32	+			+
56	Porcino	64	+			
57	Porcino	≥ 64		+		+
58	Porcino	≥ 64		+		
59	Porcino	≥ 64		+		+
60	Porcino	≥ 64		+		
61	Porcino	≥ 64		+		+
62	Porcino	≥ 64		+		+
63	Porcino	≥ 64		+		+
64	Porcino	≥ 64		+		
65	Porcino	64	+			
66	Porcino	32	+			
67	Bovino EE	≥ 64	+			
68	Bovino EE	≥ 64		+		
69	Bovino EE	≥ 64		+		

8.2.2.- Datos fenotípicos, genotípicos y presencia y caracterización de genes de resistencia a TET en el periodo 2010-2012.

<i>n</i>	Especie	CIM	<i>TetA</i>	<i>TetB</i>	<i>TetM</i>	Presencia Plásmidos
1	Aviar	≥64		+		+
2	Aviar	≥64	+			
3	Aviar	≥64	+			
4	Aviar	≥64	+			
5	Aviar	64	+			+
6	Aviar	64	+			+
7	Aviar	64	+	+		
8	Aviar	≥64		+	+	+
9	Aviar	≥64	+			+
10	Aviar	≥64	+			+
11	Aviar	≥64	+			
12	Aviar	≥64		+		+
13	Aviar	64		+		+
14	Aviar	≥64	+	+		
15	Aviar	64	+			
16	Aviar	64	+	+		+
17	Aviar	64	+			
18	Aviar	≥64	+			
19	Aviar	≥64	+			
20	Aviar	≥64	+			+
21	Aviar	64	+			+ (<i>tetA</i>)
22	Aviar	64	+			+
23	Aviar	32	+			+ (<i>tetA</i>)
24	Aviar	64	+			
25	Aviar	≥64	+			+
26	Aviar	≥64		+		+
27	Aviar	≥64	+			
28	Aviar	64	+	+		
29	Aviar	64		+		+
30	Aviar	32		+		
31	Aviar	≥64	+	+		
32	Aviar	≥64	+			
33	Aviar	≥64		+		
34	Aviar	64	+	+		+
35	Aviar	≥64	+	+		
36	Aviar	≥64	+			
37	Aviar	8			+	
38	Aviar	32	+			
39	Aviar	2	+			
40	Porcino	≥64		+		
41	Porcino	≥64		+		
42	Porcino	≥64		+		+
43	Porcino	≥64		+		+
44	Porcino	≥64	+	+		
45	Porcino	≥64	+			
46	Porcino	≥64		+		
47	Porcino	≥64		+		
48	Porcino	≥64	+			
49	Porcino	≥64	+	+		+ (<i>tetA</i>)
50	Porcino	≥64		+		+
51	Porcino	≥64		+		+

52	Porcino	≥64		+		
53	Porcino	≥64	+			
54	Porcino	≥64		+		
55	Porcino	≥64		+		
56	Porcino	≥64		+		
57	Porcino	≥64	+			
58	Porcino	≥64		+		
59	Porcino	≥64		+		
60	Porcino	≥64		+		+
61	Porcino	≥64		+		
62	Porcino	≥64	+			
63	Porcino	≥64		+		+
64	Porcino	≥64		+		+
65	Porcino	≥64		+		
66	Porcino	≥64		+		
67	Porcino	≥64		+		+
68	Porcino	≥64	+			
69	Porcino	≥64	+			
70	Porcino	≥64		+		
71	Porcino	≥64		+		
72	Porcino	≥64		+		
73	Porcino	≥64		+	+	
74	Porcino	≥64		+		
75	Porcino	≥64		+	+	+
76	Porcino	≥64		+	+	+
77	Porcino	≥64		+	+	
78	Porcino	≥64	+		+	+(tetA)
79	Porcino	≥64		+	+	+
80	Bovino EE	16		+		+
81	Bovino EE	≥64		+		+
82	Bovino EE	≥64		+		
83	Bovino EI	≥64		+		
84	Bovino EI	32	+			
85	Bovino EI	64		+		+
86	Bovino EI	≥64		+		+
87	Bovino EI	32	+			+(tetA)
88	Bovino EI	64		+		
89	Bovino EI	64		+		+
90	Bovino EI	≥64	+			
91	Bovino EI	≥64		+		
92	Bovino EI	32	+			
93	Bovino EI	≥64	+	+		
94	Bovino EI	64	+			
95	Bovino EI	32	+	+		+(tetA)
96	Bovino EI	64	+			
97	Bovino EI	32	+	+		
98	Bovino EI	32	+			
99	Bovino EI	32	+			