



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Resistencia a antibióticos en *E. coli* y *S. aureus* aislados de fuentes animales y ambientales**

Yamile Adriana Celis Bustos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Doctorado en Salud Pública  
Bogotá, Colombia  
2016

**Resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* y  
*Staphylococcus aureus* aislados de fuentes animales y  
ambientales**

**Yamile Adriana Celis Bustos**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Salud Pública**

Director (a):

Ph.D., MD María Marcela Camacho

Codirector (a):

Ph.D., VMD María del Pilar Donado

Línea de Investigación Doctorado en Salud pública:

Investigación básica en salud y en enfermedades infecciosas

Grupo de Investigación:

Biofísica y Biología de membranas

Línea de Investigación del grupo:

Microbiología y Macromoléculas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Doctorado en Salud Pública

Bogotá, Colombia

2016

*A mis padres, a mi hermano y a Camilo  
por su amor y su apoyo constante e incondicional*

# Agradecimientos

A los trabajadores, al administrador y a la familia de la granja en estudio, por su buena disposición en todo el proceso de muestro y análisis del sistema de producción, en especial a Manuel por su apoyo en la toma de muestras, entrevista y durante el desarrollo de este estudio.

A mi directora la Profesora Marcela Camacho por su apoyo, guía y excelentes aportes durante todo este proceso.

A mi co-directora la Doctora Pilar Donado y su grupo de investigación

A las Doctoras María Virginia Villegas y Adriana Correa por su aportes en la primera etapa del doctorado.

A mi equipo de trabajo Vanessa y Juan Pablo, por su amistad, apoyo incondicional y excelente trabajo en equipo. Al grupo de Biofísica y Biología de membranas por sus aportes.

A la Secretaria de Salud, en especial al Laboratorio de Salud Pública y a quién siempre será mi jefe Claudia Aguillón por su gran apoyo, a las profesionales del área de microbiología por su guía en el uso de los equipos automatizados.

Al Profesor Ramón Mantilla y su grupo por el apoyo y disponibilidad de reactivos

Al Doctorado en Salud Pública por su apoyo con monitorias y la secuenciación de dos genomas para culminar este trabajo. A Teito, Gloria y Patricia por su apoyo y paciencia.

Al Doctor Andrés Pinzón y el grupo de Bioinformática y Biología de Sistemas Computacional por su guía en el análisis bioinformático

Al Profesor Aquiles Enrique Darghan por apoyo en el análisis estadístico

A mis amigas Diana Castillo, Ximena, Erika y Natalia que me han apoyado en todo el proceso y ayudado con algunos análisis y solución de problemas. Por último a todas las personas que de alguna y otra forma aportaron para la culminación de este trabajo.

## Resumen

El uso amplio de antibióticos para tratamiento, prevención de enfermedades en animales y humanos, y en producción animal para promoción de crecimiento, está relacionado con la emergencia y diseminación de bacterias antibiótico-resistentes y genes de resistencia. Sumado a esto los residuos de antibióticos y bacterias resistentes eliminados por excretas (orina y materia fecal), el manejo de desechos en granjas y el uso de materia fecal como abono o compost, puede favorecer la diseminación de genes de resistencia y la selección de bacterias multi-resistentes a antibióticos en el ambiente. Esto se ha reconocido como un problema de Salud Pública y uno de los vacíos en vigilancia y contención de éste, se da por falta de información sobre la resistencia a antibióticos en bacterias de origen alimentario, y su impacto potencial en salud animal, humana y ambiental (WHO, 2014). Este proyecto analizó una granja de porcícola, su sistema de producción, uso de antibióticos, caracterizó fenotípicamente y molecularmente bacterias (bacterias indicadoras: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*) recuperadas de materia fecal e hisopado nasal de cerdos y trabajadores, muestras ambientales (residuos de piso de corral, hisopo de arrastre de corral y concentrado), y evaluó las relaciones entre los antibióticos utilizados durante todo el proceso de producción y la resistencia identificada en las bacterias recuperadas de las diferentes fuentes de estudio.

Las bacterias recuperadas en las muestras fueron 96% de *E. coli*, 14% de *E. faecium*, 30% de *E. faecalis* y 2% *S. aureus*. Se documentó uso de un rango amplio de antibióticos para profilaxis, principalmente quinolonas y betalactámicos. Se identificaron resistencia a antibióticos así como también genes de resistencia a estos grupos de antibióticos indicando relación entre uso y resistencia expresada. Se documentaron además genes de importancia clínica previamente reportados en aislamientos causantes de infecciones en humanos; los tipos de plásmidos identificados hacen parte de los principales grupos de incompatibilidad mostrados como los portadores más frecuentes de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas. Se identificó policlonalidad en las cepas analizadas, lo que sugiere que la transferencia de resistencia entre éstas puede estar asociada con transferencia de elementos genéticos. La información de este proyecto fue utilizada como línea de base para la caracterización de otros sistemas de producción animal, con el fin de obtener información con sustento epidemiológico para proponer nuevas estrategias de investigación y vigilancia de uso de antimicrobianos y resistencia a éstos que permitan minimizar y contener esta problemática.

**Palabras clave:** Uso de antimicrobianos, Resistencia a antimicrobianos, elementos genéticos, contención, sistemas de producción animal, transferencia horizontal.

## Abstract

The widespread use of antibiotics for treatment, prevention of disease in animals and humans, and in animal production for growth promotion is related to the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria and genes that confer resistance. Added to this, the residues of antibiotics and resistant bacteria eliminated by excreta (urine and stool), waste management on farms and the use of fecal matter as fertilizer or compost, may favor the spread of resistance genes and selection of bacteria multi-antibiotic resistant in the environment. This has been recognized as a public health problem. One of the gaps in the surveillance and containment of it, is the lack of information on antibiotic resistance in foodborne bacteria and their potential impact on animal, human and environmental health (WHO, 2014). This project analyzed a pig farm, its production system, use of antibiotics, characterized phenotypically and molecularly bacteria (the indicator bacteria: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and the pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp) recovered from feces and nasal swabs from pigs, workers, as well as environmental samples (residues floor poultry, swab drag and poultry concentrate), and evaluated the relationship between antibiotics used throughout the production process and resistance identified in bacteria recovered from different sources.

The bacteria recovered in samples were 96% of *E. coli*, *E. faecium* in 14%, *E. faecalis* in 30% and *S. aureus* in 2%. The use of a wide range of antibiotics for prophylaxis, principally quinolones and  $\beta$ -lactams was documented. Isolates showing antibiotic resistance were recovered from the collected samples. Resistance genes were also identified to the antibiotic groups used, indicating a relation between use and expressed resistance. Important genes previously reported in isolates from human infections were also identified; the types of identified plasmids are part of the main groups of incompatibility reported as the most frequent resistance genes for  $\beta$ -lactams and quinolones. Polyclonality identified in strains tested, suggests that the transfer resistance between them may be associated with transfer of genetic elements. Information from this project was used as a baseline for the characterization of other animal production systems, in order to obtain information with epidemiological support to propose new strategies for research and monitoring of antimicrobial use and resistance to minimize and contain this problem.

**Keywords:** Antimicrobial use, antimicrobial resistance, genetic elements, containment, animal production systems, horizontal transfer

# Tabla de Contenido

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>IV</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>V</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabla de Contenido .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>X</b>
<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>12</b>
<b>Resistencia a antimicrobianos, un problema de salud pública.....</b>	<b>12</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>12</b>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>13</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>15</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>17</b>
1.1.1    Objetivo General .....	17
1.1.2    Objetivos Específicos .....	17
<b>Marco Teórico .....</b>	<b>18</b>
1.1.3    Resistencia a antimicrobianos .....	18
1.1.4    Explicaciones de la resistencia bacteriana, análisis histórico .....	19
1.1.5    Explicaciones a la resistencia bacteriana.....	23
1.1.6    Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	28
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>31</b>
<b>Granja porcícola, Modelo de estudio de la resistencia a antimicrobianos extrahospitalaria .....</b>	<b>31</b>
<b>Diseño metodológico.....</b>	<b>33</b>
1.1.7    Diseño del estudio.....	33
1.1.8    Recolección de datos.....	33
<b>Resultados.....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>41</b>

<b>Resistencia a antimicrobianos en la granja de estudio .....</b>	<b>41</b>
<b>Microorganismos en estudio .....</b>	<b>41</b>
<b>Diseño metodológico.....</b>	<b>44</b>
1.1.9    Cálculo de la muestra: .....	44
1.1.10  Recolección de muestras.....	44
<b>Adquisición, recuperación y aislamiento de bacterias de muestras de animales, trabajadores y ambiente de la granja.....</b>	<b>46</b>
<b>Perfil de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos logrados y discriminados por fuente de origen (antibiogramas) .....</b>	<b>48</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>59</b>
<b>El origen de la resistencia antimicrobiana depende de genes cromosomales y extracromosomales.....</b>	<b>59</b>
<b>Transmisión génica en bacterias .....</b>	<b>59</b>
<b>Origen ambiental de resistencia .....</b>	<b>60</b>
<b>Preservación de la resistencia.....</b>	<b>61</b>
<b>Diseño metodológico.....</b>	<b>62</b>
1.1.11  Determinación del mecanismo genético que explica la resistencia encontrada en aislamientos con susceptibilidad antibiótica disminuida .....	63
<b>Resultados.....</b>	<b>70</b>
1.1.12  Identificación de relaciones genéticas de los aislamientos obtenidos (dendrogramas).....	70
1.1.13  Genes de resistencia identificados .....	79
<b>Conclusiones .....</b>	<b>91</b>
<b>Capítulo 5.....</b>	<b>93</b>
<b>Confirmación de la resistencia antimicrobiana en la granja de estudio .....</b>	<b>93</b>
<b>Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....</b>	<b>93</b>
<b>Diseño metodológico.....</b>	<b>94</b>
1.1.14  Secuenciación del genoma completo por Illumina MiSeq .....	94
<b>Resultados.....</b>	<b>95</b>
<b>Capítulo 6.....</b>	<b>101</b>

<b>Discusión: Modelo de Resistencia a antimicrobianos y Propuesta de vigilancia .....</b>	<b>101</b>
<b>Resistencia a antibióticos según el Sistema de vigilancia de resistencia a antimicrobianos</b>	
<b>(DANMAP).....</b>	<b>104</b>
<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>119</b>
<b>Tesis.....</b>	<b>121</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>122</b>
<b>Anexo A. Encuesta 1: Cuestionario de Muestreo en Granja .....</b>	<b>122</b>
<b>Anexo B. Encuesta 2: Uso de antimicrobianos .....</b>	<b>129</b>
<b>Anexo C: Consentimiento informado .....</b>	<b>133</b>



## Lista de figuras

Figura 1. Distribución de la granja, proceso de producción y uso de antimicrobianos..	36
Figura 2. Toma de muestras en la granja en estudio .....	45
Figura 3. Número y porcentaje de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos por área. ....	55
Figura 4. Número de <i>E. faecium</i> resistentes a antibióticos por área.....	56
Figura 5. Número y porcentaje de <i>E. faecalis</i> resistentes a antibióticos por área. ....	57
Figura 6. Número y porcentaje de <i>S. aureus</i> resistentes a antibióticos por área.....	58
Figura 7. Relaciones genéticas de cepas de <i>E. coli</i> del área de montas.....	71
Figura 8. Relaciones genéticas de <i>E. coli</i> del área de gestantes.....	72
Figura 9. Relaciones genéticas de <i>E. coli</i> del área de partos. ....	73
Figura 10. Relaciones genéticas de <i>E. coli</i> del área de pre-ceba. ....	74
Figura 11. Relaciones genéticas de <i>E. coli</i> del área de ceba. ....	76
Figura 12. Relaciones genéticas de <i>E. faecium</i> recuperadas en la granja. ....	77
Figura 13. Relaciones genéticas de <i>E. faecalis</i> . ....	78
Figura 14. Relaciones genéticas de <i>S. aureus</i> .....	79
Figura 15. Genes de resistencia a $\beta$ -lactámicos identificados por área. ....	80
Figure 16. Resistencia a $\beta$ -lactámicos en las cepas en estudio. ....	81
Figure 17. Resistencia a colistin identificado por área. ....	82
Figure 18. Resistencia a Colistin.....	82
Figure 19. Resistencia a quinolonas en los aislamientos en estudio. ....	84
Figure 20. Resistencia a quinolonas. ....	84
Figure 21. Frecuencia de genes <i>int1-3</i> , <i>sul1-2</i> y <i>qacE1</i> en <i>E. coli</i> .....	86
Figure 22. Integrones identificados y genes de resistencia a sulfonamidas. ....	86
Figure 23. Amplificación de grupos de incompatibilidad de plásmidos .....	88
Figure 24. Análisis de secuencias de <i>E. coli</i> # 1 por subsistemas.....	96
<b>Figure 25.</b> Análisis de secuencias de <i>E. coli</i> # 16 por subsistemas. ....	97
<b>Figure 26.</b> Análisis de secuencias de <i>E. faecium</i> #46 por subsistemas.....	98
<b>Figure 27.</b> Análisis de secuencias de <i>S. aureus</i> # 14 por subsistemas .....	100
<b>Figure 28.</b> Modelo de resistencia a antibióticos en la granja en estudio. ....	111

## Lista de tablas

Tabla 1. Información recuperada de la encuesta aplicada a trabajadores y administrador de la granja .....	34
Tabla 2. Antimicrobianos utilizados en la granja, relacionados por uso y animales ....	37
Tabla 3. Número de infecciones al año, tratamiento y medicamentos utilizados.....	38
Tabla 4. Número de animales, muestras analizadas y tipo de muestras recolectadas	46
Tabla 5. Número de animales disponibles en el momento del muestreo y animales analizados por área .....	49
Tabla 6. Número de aislamientos recuperados por muestras analizadas, género y especie identificados .....	50
Tabla 7 . Iniciadores para confirmación de género y especie en aislamientos de <i>Enterococcus spp</i> .....	51
Tabla 8. Número de aislamientos de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> identificados por equipo automatizado y confirmados por PCR.....	51
Tabla 9. Proporción y porcentaje de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i> por área y tipo de muestra .....	52
Tabla 10. Número y porcentaje de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos por área .....	54
Tabla 11. Número y porcentaje de resistencia a antibióticos en <i>E. faecium</i> por área y tipo de muestra.....	56
Tabla 12. Número y porcentaje de resistencia a antibióticos en <i>E. faecalis</i> por área y tipo de muestra.....	56
Tabla 13. Número y porcentaje de resistencia a antibióticos en <i>S. aureus</i> por área y tipo de muestra.....	57
Tabla 14. Iniciadores utilizados para la múltiplex 1: <i>TEM-SHV</i> y <i>OXA.-1</i> .....	63
Tabla 15. Iniciadores utilizados para múltiplex II: <i>CTX-M</i> grupo 1, 2, 8, 9 y 25 .....	64
Tabla 16. Iniciadores utilizados para múltiplex III: <i>ACC, FOX, MOX, DHA, CIT Y EBC</i> .....	64
Tabla 17. Iniciadores para el gen <i>MCR-1</i> .....	65
Tabla 18. Iniciadores para la amplificación de genes que confieren resistencia a quinolonas .....	66
Tabla 19. Iniciadores utilizados para la detección de los genes <i>Int1, 2, 3, Sul1-2, qacE1</i> .....	67
Tabla 20. Iniciadores para la identificación de 18 grupos de incompatibilidad de plásmidos. ....	68
Tabla 21. Iniciadores para el gen <i>OptrA</i> .....	69

Tabla 22. Genes de resistencia a $\beta$ -lactámicos identificados por área y tipo de muestra .....	80
Tabla 23. Aislamientos portadores del gen <i>mcr-1</i> positivos para colistin identificadas por área .....	82
Tabla 24. Resistencia a quinolonas en los aislamientos en estudio .....	83
Tabla 25. Frecuencia de genes <i>int1-3</i> , <i>sul1-2</i> y <i>qacE1</i> en <i>E. coli</i> .....	85
Tabla 26. Frecuencia de genes de resistencia y grupos de incompatibilidad en aislamientos de <i>E. coli</i> multirresistentes por área .....	87
Tabla 27. Aislamientos de <i>Enterococcus faecalis</i> portadores del gen <i>OptrA</i> identificados por área .....	89
Tabla 28. Resultados de los modelos aplicados para evaluar la relación entre el uso de antimicrobianos y la resistencia a dos o más antibióticos en los aislamientos de <i>E. coli</i> con un efecto identificado.....	89
Tabla 29. Resultados de los modelos aplicados para evaluar la relación entre el uso de antimicrobianos y los genes de resistencia identificados en los aislamientos de <i>E. coli</i> con un efecto identificado.....	90
Tabla 30. Resultados de los modelos aplicados para evaluar la relación entre la resistencia a dos o más antimicrobianos y los genes de resistencia <i>Int1-3</i> , <i>Sul1</i> , <i>Sul2</i> , <i>qac<math>\Delta</math></i> y el uso de sulfonamidas en los aislamientos de <i>E. coli</i> con un efecto identificado .....	91
Tabla 31 Tipo de cepa circulante analizada por secuenciación .....	95

# Capítulo 1

## Resistencia a antimicrobianos, un problema de salud pública

### Introducción

El uso amplio de antimicrobianos para tratamiento y prevención de enfermedades en animales y humanos, y en producción animal, está relacionado con la emergencia y diseminación de bacterias antibiótico-resistentes (González-zorn, 2016; Martínez, 2009; Pereira *et al.*, 2014). Este se ha reconocido como un problema de Salud Pública, por el impacto que ocasiona en salud humana y animal. Enfermedades ocasionadas por bacterias resistentes están asociadas a infecciones de difícil manejo, larga hospitalización, costo económico alto y sobre todo aumento en mortalidad (Baquero, 2015; Cantón, 2013).

Diferentes organizaciones gubernamentales, entre ellas la Organización Mundial de la Salud (OMS), han propuesto una serie de estrategias, para reducir la resistencia a antibióticos o antimicrobianos. Entre ellas, promover el uso prudente de antibióticos en sectores de interés (animal, humano y ambiental), fortalecer sistemas de vigilancia, reducir la incidencia de infección a través de efectiva sanitización, higiene y aplicación de adecuadas medidas de prevención e infección, instaurar leyes que regulen el uso de antimicrobianos y por último, desarrollar y apoyar el diseño de estudios que proporcionen datos comparables de la emergencia y diseminación de resistencia a antibióticos en los diferentes sectores de interés (WHO, 2001, 2014b, 2015). Esta propuesta se enmarca en esta última estrategia.

En la actualidad a las propuestas antes descritas se han sumado una serie de estrategias para mejorar el conocimiento y la comprensión sobre esta problemática mediante una comunicación eficaz, educación y entrenamiento, además se ha propuesto el desarrollo de una justificación económica para la inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos países y aumente la inversión en nuevas medicinas, herramientas diagnósticas, vacunas y otras intervenciones (WHO, 2015). A estas estrategias se han sumado otros sectores como la industria farmacéutica, que busca reducir el desarrollo de resistencia a antimicrobianos, mejorando la conservación y prescripción de antibióticos, concientizando a los doctores, farmacéuticos y veterinarios sobre la importancia de prescribir menos cantidades de antibióticos; aumentando la inversión en investigación en nuevos antibióticos, diagnóstico, vacunas

y otros tratamientos alternativos, y por último mejorando el acceso a antibióticos de alta calidad para todos ([IFPMA, 2016](#)).

El sector de mayor interés en la actualidad es el animal, por las tasas altas de resistencia que se han identificado en patógenos y microbiota intestinal de animales de producción como vacas, aves, cerdos y peces, y, por la fácil transmisibilidad de bacterias y genes de resistencia entre animales, humanos y ambiente. Por esta razón, este proyecto buscó identificar asociaciones entre el uso de antimicrobianos en una granja porcícola, la resistencia a antimicrobianos en bacterias de la microbiota de animales y sus cuidadores (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*), patógenos (*Salmonella spp*), y bacterias aisladas de muestras ambientales (residuos de corral, hisopo de arrastre de corral y concentrado).

## **Planteamiento del problema**

Los antibióticos son los medicamentos más exitosos desarrollados para mejorar la salud humana. Estos son utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos ([Walsh, 2003](#)), para prevenir y tratar infecciones en animales ([Marshall & Levy, 2011](#)), y plantas ([Ibekwe, 2011](#)), como promotores de crecimiento en animales de granja ([Aarestrup, 2000](#); [Marshall & Levy, 2011](#)), y en cultivos masivos para la selección de plantas transgénicas ([Keese, 2008](#)). Como consecuencia de esto, puede haber liberación de estos compuestos al ambiente y se ha demostrado que concentraciones bajas, pueden ser suficientes para desencadenar resistencia a antibióticos mediante la inducción de respuestas transcripcionales específicas o generando mutagénesis en bacterias ([Kohanski, 2010](#))

La diseminación y expansión de bacterias resistentes es evidencia en tiempo real de su evolución, en respuesta a la presión dada por el uso terapéutico y no terapéutico de agentes antimicrobianos. Este fenómeno refleja el proceso típico de adaptación y selección de microorganismos a través de mutaciones y/o adquisición de nuevo material genético ([Davies, 2010](#); [Koonin, 2009](#)). Otro aspecto importante, es la fácil transmisibilidad de esta resistencia entre microorganismos causantes de enfermedades en humanos y la microbiota de éstos, animales y bacterias ambientales ([Courvalin, 2008](#); [Creager, 2007](#); [Choffnes, 2010](#); [Martinez, 2009](#)).

A nivel hospitalario se han desarrollado una serie de estudios que muestran

una asociación significativa entre el aumento del uso de antimicrobianos entre ellos quinolonas y la disminución en la susceptibilidad a estos antibióticos en microorganismos causantes de infecciones en Unidades de Cuidado Intensivo (Neuhauser, 2003), por otro lado un estudio llevado a cabo en un hospital en Alemania demostró el impacto que las políticas de prescripción de antibióticos genera en las tasas de resistencia bacteriana en infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Lepper, Grusa, Reichl, Högel, & Trautmann, 2002), así como el uso antibióticos para el tratamiento y mantenimiento de enfermedades crónicas como la fibrosis quística y cáncer de pulmón contribuye en la aparición y diseminación de bacterias causantes de infecciones respiratorias multirresistentes (Serisier, 2013), problema no solo descrito en bacterias gram negativas, un estudio desarrollado en un centro de manejo de cáncer, mostró el impacto que la terapia con daptomicina generó por su uso empírico para el tratamiento de *Enterococcus resistente a vancomicina* (VRE), llevando al aumento de infecciones por estos microorganismos a pesar de los esfuerzos realizados en la institución para disminuir el número de bacteremias por VRE resistentes a daptomicina (Kamboj et al., 2011).

El uso amplio de estos antimicrobianos está relacionado con emergencia y diseminación de infecciones antibiótico-resistentes en animales y humanos (Levy & Marshall, 2004), transferencia de bacterias resistentes y genes de resistencia entre humanos a través del consumo de alimentos de origen animal, contacto directo con animales de granja y mecanismos de resistencia adquiridos en el ambiente (WHO/EURO, 2012). En el caso de animales de granja, el uso de estos antimicrobianos favorece crecimiento por promoción de ganancia de peso y disminución del costo de alimentación, lo que hace esta práctica frecuente en la producción de aves, cerdos, vacas y peces (Levy & Marshall, 2004; Martinez, 2009).

El departamento de seguridad alimentaria y zoonosis de la OMS afirma que el uso de antimicrobianos en animales afecta la salud humana, debido a que la mayoría de enfermedades transmitidas por alimentos son zoonosis, es decir, son enfermedades que se transmiten desde animales a humanos (WHO/EURO, 2012). Estas involucran bacterias resistentes asociadas a infecciones de difícil manejo, larga hospitalización, alto costo económico y aumento en mortalidad. Además, advierten que el uso de antimicrobianos en comida animal selecciona bacterias zoonóticas que pueden transferir genes de resistencia a patógenos humanos. Prueba de esto son algunos estudios que muestran transferencia de bacterias y genes de resistencia entre humanos y animales y viceversa (Keen & Montforts, 2012; Morgan, 2008).

Este proyecto identificó los antimicrobianos de uso más frecuente en una granja porcícola, evaluó la resistencia a estos en bacterias de la microbiota intestinal en animales y trabajadores de la granja. Además, determinó la relación entre la microbiota intestinal y nasofaríngea de los animales en estudio y los trabajadores de granja, siguiendo los lineamientos establecidos por algunos sistemas de vigilancia ([Agero, 2010](#)),

Por otro lado, se caracterizaron los principales genes de resistencia y grupos de incompatibilidad de plásmidos<sup>1</sup> portadores de genes de resistencia, identificando cuáles son los más frecuentes en microbiota de cerdos, trabajadores de la granja en estudio, microorganismos aislados del ambiente de la granja y permitió sugerir relaciones entre genes y plásmidos identificados con los descritos en bacterias causantes de infecciones en humanos. Con la identificación de los grupos de incompatibilidad de plásmidos fue posible relacionar la frecuencia de algunos genes de resistencia, con transmisibilidad de determinantes, lo cual explicaría la tasa de resistencia alta que se ha mantenido durante los últimos años a clases específicas de antibióticos, como son tetraciclinas y fluoroquinolonas ([Livermore, 2012](#)).

## **Justificación**

El uso de antibióticos en animales para consumo humano está asociado con beneficios para la industria pecuaria, pero con riesgo potencial en salud pública. En producción animal los antibióticos son utilizados para tratar y/o prevenir enfermedades, mejorar tasas de crecimiento y eficiencia de consumo de alimentos ([Aarestrup, et al., 2000](#); [Varga, et al., 2009](#)). Los riesgos en salud pública relacionados con el uso de antibióticos en la industria pecuaria, son la contaminación de alimentos con microorganismos resistentes, la liberación de residuos al ambiente, la selección de bacterias resistentes y diseminación de bacterias o genes de resistencia a cuidadores de dichos animales. La presión antibiótica impuesta por el uso de diversas clases de antibióticos en la producción de animales de consumo humano, puede estar

---

<sup>1</sup> Plásmidos: pequeñas moléculas de DNA circular extracromosomal que se replican independientemente del cromosoma y llevan genes que le confieren ventajas de supervivencia a las bacterias como: resistencia a antibióticos, virulencia y patogenicidad.

relacionada con la resistencia a antibióticos expresada en animales, humanos y en el medio ambiente (Rajic *et al.*, 2006).

En este estudio se seleccionó como modelo de análisis una granja porcícola donde utilizan antimicrobianos para tratamiento de enfermedades infecciosas, prevención y desinfección. Esta información aporta en la comprensión de la transmisión de cepas antibiótico-resistentes y el impacto que medios no hospitalarios pueden estar ejerciendo. Además permite formular protocolos para implementar en estudios de otros sistemas de producción que determine si es necesario limitar o prohibir el uso de antibióticos en producción animal, con el fin de reducir el riesgo en salud humana y animal y la viabilidad de estas medidas para la producción animal.

Este estudio evidencia asociación entre el uso de antibióticos en un ambiente no hospitalario y resistencia a estos en microorganismos aislados, datos que aportan para establecer medidas preventivas y correctivas, con el fin de reducir el riesgo en la salud humana y animal de la población en estudio. Dentro de las recomendaciones estaría minimizar el uso innecesario de antibióticos, junto con medidas de prevención, higiene y bioseguridad para control de infecciones y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos en la granja.

### **Pregunta general de investigación**

¿El problema de resistencia a antibióticos en salud pública está asociado con el uso de antimicrobianos en producción animal?

## **Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo General**

Establecer la relación entre el uso de antimicrobianos en producción animal y la aparición de bacterias resistentes en una granja porcícola

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar el sistema de producción en la granja en estudio, con énfasis en el uso de antibióticos, asociaciones potenciales de resistencia, manejo y distribución de animales, interacciones: animales – trabajadores de la granja - ambiente, y manejo de residuos
- Adquirir, recuperar y aislar bacterias de muestras de animales, trabajadores de la granja y ambiente
- Establecer el perfil de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos logrados y discriminados por fuente de origen (antibiogramas)
- Identificar las relaciones genéticas de los aislamientos obtenidos (dendogramas)
- Determinar el mecanismo genético que explica la resistencia encontrada en aislamientos con susceptibilidad antibiótica disminuida (cromosomal o extracromosomal)
- Establecer un modelo de resistencia a antibióticos en la granja en estudio

## Marco Teórico

### 1.1.3 Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a antibióticos se define como la capacidad que han adquirido algunos microorganismos de tolerar exposiciones a concentraciones clínicamente relevantes de antibióticos ([Choffnes & Rapporteurs, 2010](#)). El desarrollo de esta característica es inevitable ya que representa un aspecto natural de la evolución bacteriana, que puede resultar de mutaciones en genes reguladores o estructurales o, por adquisición horizontal de información genética foránea, y en un contexto ambiental específico. Este proceso natural se ha acelerado y expandido globalmente, en respuesta a la presión ejercida en diferentes ambientes, por el uso, mal uso y uso excesivo de antimicrobianos ([Courvalin, 2008a](#); [Choffnes & Rapporteurs, 2010](#); [Lederberg, 2000](#)). En este trabajo se hablará de antimicrobianos para cobijar antibióticos y otros agentes, por ejemplo desinfectantes.

La probabilidad de generar resistencia se asocia con exposición prolongada a un antibiótico determinado. Esta capacidad emerge sólo cuando están presentes los microorganismos resistentes y sus determinantes, los cuales se expresan juntos en un ambiente o microorganismo determinado; éste junto con el gen(es) de resistencia, se diseminan y propagan bajo exposición antibiótica continua, amplificando y extendiendo el problema a otros microorganismos y otras localizaciones geográficas ([Levy & Marshall, 2004](#)).

La presión ejercida por la presencia de antibióticos en un ambiente determinado, puede promover expresión de genes que no estaban siendo expresados (es decir ya presentes en el genoma o en elementos extracromosomales), cambios (mutaciones) en zonas puntuales de genes presentes que se pueden traducir en la expresión de proteínas con estructura diferente que podría alterar la función original, o adquisición de nuevos determinantes genéticos (genes) de resistencia por transferencia horizontal ([Davies & Davies, 2010](#)). Como ya se mencionó, la adquisición de material genético por transferencia horizontal (HGT) se da sin necesidad de exposición a antibióticos y ha jugado un papel importante en evolución bacteriana, contribuyendo a su diversidad ([Levy, 2005](#); [Levy & Marshall, 2004](#); [Wiedenbeck & Cohan, 2011](#)).

La resistencia empieza a ser un problema clínico cuando las cepas resistentes

comprometen la efectividad de la terapia antibiótica utilizada. El nivel de exposición del patógeno al antibiótico (tiempo, cantidad, combinación, tipo), influye en la selección de microorganismos resistentes. Este depende de la farmacocinética<sup>2</sup> y farmacodinamia<sup>3</sup> del antibiótico, parámetros que afectan la eliminación del patógeno o la selección de variantes (cepas) resistentes (Kohanski *et al.*, 2010).

La diseminación de bacterias resistentes depende de las condiciones de higiene y control de la transmisión de estos microorganismos a nivel hospitalario así como de la cantidad y distribución de antibióticos que son liberados al ambiente. La presencia de microorganismos resistentes aquí, lleva a la existencia de un gran reservorio de genes de resistencia en la microflora normal humana y animal que pueden potencialmente servir como donantes para la transferencia de resistencia a patógenos humanos, animales y ambientales (Gerzova *et al.*, 2015; Keen & Montforts, 2012; Marshall & Levy, 2011).

#### **1.1.4 Explicaciones de la resistencia bacteriana, análisis histórico**

Históricamente dos teorías, han explicado la evolución; cómo los organismos adquieren características nuevas o adaptan las constitutivas para sobrevivir y mantenerse en un ambiente determinado. La teoría de adaptación de Lamarck, se basa en la premisa que la evolución está dada por cambios fenotípicos y genotípicos a lo largo del tiempo, generados por variaciones ambientales (acondicionamiento), que le permiten al organismo adaptarse al medio modificado; éstas serían deterministas y se transmitirían de una generación a otra (Koonin & Wolf, 2009). Por otro lado, está la teoría de selección natural de Darwin que da mayor importancia a cambios al azar (mutaciones), que proporcionan ventajas sobreviviendo los que ante una presión determinada presentan la característica que les permite adaptarse (aptos) y son seleccionados sobre aquellos que carecen de ésta (Creager, 2007; Koonin & Wolf, 2009).

---

<sup>2</sup> mecanismo de absorción y distribución del medicamento, la concentración en la cual es efectivo, la duración de su efecto, los cambios químicos del agente por el metabolismo del organismo, los efectos y rutas de excreción de metabolitos

<sup>3</sup> características del fármaco que incluyen los efectos de este en el organismo, su mecanismo de acción, y la relación entre concentración y efecto

## Evolución bacteriana

Curiosamente la comprensión sobre las causas de la resistencia a antibióticos permitió dilucidar la variación bacteriana y su evolución, donde explicaciones de adaptación y entrenamiento han sido argumentadas. Estos debates surgieron cuando se reconocieron las bacterias como organismos vivos con material genético similar al de células eucariota. Las bacterias se reproducen asexualmente por fisión binaria, donde el material genético es transferido verticalmente de la célula madre a la hija. Sin embargo, pueden también recibir material genético por transferencia horizontal de genes (HGT<sup>4</sup>) a través de elementos genéticos móviles (transposones, plásmidos, bacteriófagos). Hoy sabemos que el patrón de evolución bacteriano está relacionado con la organización de su genoma, tasa de mutación y sistemas de HGT ([Rosselló-Mora & Amann, 2001](#)), desconocidos cuando se iniciaron los primeros estudios de su caracterización.

La clasificación bacteriana se basó en herramientas usadas en eucariota, pero al reconocer las diferencias de organización celular, se desarrollaron técnicas y un esquema taxonómico de características morfológicas. Bacterias con la misma forma se agruparon dentro de una misma especie aunque, al analizar su respuesta fisiológica en el mismo medio ésta era diferente, surgiendo la necesidad de explicar por qué. Estos análisis fueron desarrollados por bacteriólogos y bioquímicos de la época, quienes asumían que las condiciones a las cuales eran expuestas inducían cambios que se mantenían de una generación a otra, apoyando la visión Lamarckiana.

La limitación de los bacteriólogos al investigar procesos de evolución y variación bacteriana según Amsterdamska, partió de los conceptos utilizados y su enfoque biomédico, dado que orientaron sus estudios en aislamiento, caracterización de patógenos y análisis terapéutico. Para los bacteriólogos, las bacterias adquirían material genético sólo por fisión binaria. Asimismo seguían los postulados de Cohn-Koch de monomorfismo, que incluían conservación morfológica o fisiológica dentro de una especie, argumentando que organismos individuales de una especie dada, al tener las mismas características crecían igual en medios específicos y causaban enfermedad sin sufrir cambios ([Amsterdamska, 1987, 1991](#); [Hadley, 1927](#)).

---

<sup>4</sup> Del inglés Horizontal gene transfer

Cole y Wright en 1916, sustentaron variabilidad bacteriana y un nuevo sistema de clasificación basados en caracteres morfológicos y fisiológicos, acorde con Winslow, para agrupar por especie microorganismos con propiedades únicas diferenciables, por género especies relacionadas con características comunes y por familia a géneros con caracteres similares. La variabilidad identificada en cultivos bacterianos llamó la atención y así se identificaron dos tipos de variaciones ocasionadas dentro de la célula o impuestas por condiciones ambientales (Cole & Wright, 1916).

El análisis de características morfológicas y fisiológicas de bacterias mostró su amplia plasticidad, hallazgo que contrastaba con el monomorfismo. Se demostró que un cultivo bacteriano es una mezcla de poblaciones con diferentes características fisiológicas y cómo el ambiente influye en la multiplicación y subsistencia de subpoblaciones; bajo ciertas condiciones algunos biotipos se pierden o son minoría, mientras otros se mantienen y adaptan (Yudkin, 1936). A la par del desarrollo de herramientas de análisis de células eucariota, se implementaron estrategias de estudio en bacterias. La identificación de mutaciones en plantas, llevó al análisis de éstas en bacterias, resaltando la importancia de caracterizar subpoblaciones que hacen parte de un cultivo.

Los primeros estudios realizados para explicar variaciones morfológicas y fisiológicas en bacterias y mutaciones como causa de éstas fueron planteados por Neisser en 1906 y Massini en 1907, en donde analizaron ¿Por qué aislamientos de *E. coli* que no fermentaban lactosa, después de ser sometidos a crecimiento en medio con lactosa adquirirían esta característica?. Según Massini esta habilidad era resultado de mutaciones, y por esta razón fueron denominadas *E. coli* mutables, sin evidencia genética, ni análisis profundo de cómo surge esta variante (Amsterdamska, 1991; Hadley, 1927; Yudkin, 1936). Con base en estos hallazgos se desarrollaron otros experimentos para analizar los cambios identificados en diferentes cultivos bacterianos.

En 1921 Arkwright fue el primero en demostrar que en cultivos de una misma especie era posible encontrar bacterias con diferentes características morfológicas e identificó 2 tipos de colonias que denominó lisas o rugosas. Orientado por la pregunta si éstas diferencias indicaban presencia de microorganismos con ventajas adaptativas, las bacterias identificadas fueron sometidas a crecimiento bajo diferentes condiciones concluyendo que estas dos formas se diferenciaban en morfología, crecimiento,

reacciones serológicas, bioquímicas y virulencia, donde las colonias lisas tenían ventajas adaptativas, al ser resistentes a la acción lítica de bacteriófagos, a diferencia de las rugosas ([Arkwright, 1921](#)). Con estos resultados, bacteriólogos en diferentes instituciones se cuestionaron si era posible transformar bacterias con características morfológicas y adaptativas específicas (lisas, no virulentas) en más aptas (rugosas y virulentas). Utilizando como modelo *Streptococcus pneumoniae*, Avery indujo éstas, e identificó que la información que generaba dichos cambios, se encontraba en una fracción no proteica heredable de la bacteria, y transferible de una bacteria a otra por contacto de vivas no virulentas con muertas virulentas. Hoy este proceso se denomina transformación, DNA de la bacteria lisada es captado por la bacteria viva proporcionándole virulencia y cambios morfológicos. Esta fue la primera evidencia del papel del DNA como material genético, de la transferencia de caracteres heredables y la capacidad bacteriana de captar información genética para sobrevivir en un ambiente determinado ([Amsterdamska, 1993](#); [Avery, 1943](#)).

Para 1930 las investigaciones se enfocaron en estudios nutricionales de bacterias y levaduras, representando la variación en términos de adaptación química. La hipótesis planteada para explicar el proceso de variación era que una población de células en contacto con un sustrato adquiere con el tiempo enzimas necesarias para metabolizarlo, adaptación enzimática, donde hay enzimas adaptativas sintetizadas por las células cuando están en contacto con el sustrato y constitutivas, presentes sin tener en cuenta el sustrato ([Barnett, 2004](#); [Creager, 2007](#)).

Dienert y Monod se preguntaron ¿cómo se daba la adaptación y regulación enzimática en diferentes fuentes de azúcar?. Para responder esto, cultivaron levaduras con diferentes azúcares y analizaron su tasa de fermentación. Encontraron que la tasa de fermentación de galactosa depende del azúcar presente en el medio de cultivo, a diferencia de la tasa de fermentación de glucosa que es independiente. Además indicaron la relación entre la fuente de azúcar (galactosa, lactosa o melibiosa) en el medio de cultivo y la actividad enzimática (galactosidasa); así microorganismos que crecían en galactosa, al cultivarlos en glucosa perdían dicha actividad. Estos resultados enfatizan el papel del sustrato en la tasa de fermentación de galactosa y el desarrollo de la actividad enzimática (galactosidasa), asegurando que la actividad enzimática era adaptativa. A pesar de los hallazgos, la metodología utilizada no permitió responder la pregunta planteada; con estos experimentos se documentó cómo estas levaduras se pueden adaptar a un medio específico pero no el papel del azúcar utilizado en la regulación de la expresión de la enzima. Por esta razón

Stephenson y Yudkin los refutaron, argumentando falta de cuantificación que limitaba la interpretación (Barnett, 2004; Stephenson & Gale, 1937).

Para dar una explicación más rigurosa a lo planteado por Dienert y Monod, Stephenson y Yudkin enfatizaron en la fisiología, postulando que las bacterias adaptaban su maquinaria metabólica a las oportunidades ambientales (Stephenson & Gale, 1937; Yudkin, 1936). Así, analizaron ¿en qué condiciones se desarrollaban las enzimas que fermentaban galactosa y glucosa en *E. coli* y qué relación había entre la formación, actividad enzimática y multiplicación celular?. Concluyeron que la acción de dichas enzimas se daba por un proceso de adaptación química. Stephenson invirtió tiempo y esfuerzo para explicar cómo la glucosa suprime la síntesis de galactosidasa, sin aclarar el mecanismo de adaptación y variación (Kohler, 1985; Stephenson & Gale, 1937).

Hacia 1960 Jacob y Monod explicaron el metabolismo de lactosa en *E. coli* bajo el control de un grupo de genes que denominaron operón *Lac*, constituido por tres genes: promotor, represor y operador. Este operón es regulado por la disponibilidad de lactosa y glucosa del medio. Así, cuando hay lactosa (inductor) se produce galactosidasa, promoviendo transcripción y síntesis de la enzima. Otros compuestos del medio pueden actuar como represores inhibiendo la transcripción de la enzima (Jacob, 1960). Estos hallazgos mostraron que la acción de la galactosidasa es un proceso complejo que para ser entendido requería análisis genético.

### **1.1.5 Explicaciones a la resistencia bacteriana**

Basándose en estos estudios, se llevaron a cabo experimentos en bacterias aisladas de pacientes, para mostrar que la resistencia identificada, era causada por acción de enzimas adaptativas que hidrolizaban el antibiótico y surgen en microorganismos susceptibles si son sometidos a diferentes concentraciones del medicamento (entrenamiento). Desde 1945 en adelante hubo una ráfaga de publicaciones sobre el crecimiento y características de resistencia a antibióticos en microorganismos aislados de pacientes y cepas de laboratorio, que explicaban cómo las bacterias pueden adaptarse y multiplicarse en presencia de antimicrobianos aunque inicialmente inhibieran su crecimiento (Fildes & Whitaker, 1948; Hadley, 1927).

En 1940 Luria y Delbrück dieron una explicación diferente a la variación y resistencia a antibióticos, tomando de la física de radiación un enfoque estadístico para sus análisis. Partieron de las observaciones hechas por D'Hérelle y otros investigadores, quienes afirmaban que la interacción de bacterias con bacteriófagos inducía variantes resistentes que se adaptaban al medio, en contraste con lo expuesto por Burnet y Gratia, quienes aseguraban que las bacterias resistentes son resultado de mutaciones pre-existentes a la interacción bacteria-bacteriófago, las cuales eran seleccionadas por acción lítica del virus que eliminaba a las susceptibles (Hadley, 1927; Luria & Delbrück, 1943). Estas dos hipótesis llevaron a Luria y Delbrück a plantear las siguientes preguntas: ¿Cómo se origina la resistencia a la infección por bacteriófagos y cuál de las hipótesis antes expuestas puede explicar dicha resistencia?. El experimento consistió en inocular un número pequeño de bacterias a partir de una misma colonia, en diferentes tubos de ensayo. Después de un periodo de crecimiento, inocularon el mismo volumen de bacterias de cada tubo de ensayo en diferentes placas con agar que contenía el bacteriófago. Argumentando que si la resistencia era generada por la interacción bacteria-virus, es decir por un proceso de adaptación, en todas las placas se esperaría un número similar de bacterias resistentes. Sin embargo, los resultados obtenidos luego del análisis estadístico mostraron que el número de colonias resistentes variaba drásticamente de una placa a otra a pesar de que todas fueron inoculadas con el mismo número y bajo las mismas condiciones. Luria y Delbrück explicaron estos resultados como una tasa constante de mutaciones aleatorias heredables en cada generación bacteriana de cada tubo, las cuales surgieron de manera independiente a la interacción con el virus, apoyando así la hipótesis planteada por Burnet y Gratia. A pesar de los resultados obtenidos, se expuso la necesidad de estudiar a fondo la resistencia identificada en bacterias que crecían tiempo después de la lisis de bacterias sensibles, porque la atribuían a un mecanismo más complejo (Luria & Delbrück, 1943). Para esta época no se conocía el papel de los elementos genéticos extracromosomales en la resistencia bacteriana, ni se contaba con herramientas para profundizar en este aspecto.

Los resultados de estos experimentos se convirtieron en un hito para la genética, ya que pareció ser una de las primeras demostraciones claras que la herencia en bacterias no era Lamarckiana. Sin embargo, no todos los genetistas bacterianos estuvieron de acuerdo con este análisis. Sonneborn señaló que lo que estos autores vieron como mutaciones espontáneas podía ser resistencia adquirida que persistió durante varias generaciones (Creager, 2007).

Demerec usando el diseño experimental planteado por Luria y Delbrück estudió el origen de la resistencia a penicilina en *S. aureus* señalando la analogía entre resistencia bacteriana a agentes infecciosos (bacteriófagos) y resistencia a sustancias químicas (antibióticos). El experimento mostró variación amplia en el número de bacterias resistentes a penicilina en muestras de cultivos independientes, lo cual apoyaba la interpretación genética del origen de la resistencia y la acción de la penicilina como un agente selectivo que inhibe bacterias no resistentes. Demerec señaló que era posible aumentar el grado de resistencia al antibiótico, exponiendo cepas resistentes a alta concentración de penicilina y lo interpretó como la suma del efecto de varios factores genéticos independientes sometidos a mutaciones consecutivas sustentado las explicaciones expuestas por Luria y Delbrück (Demerec, 1945, 1948).

El uso de la prueba de fluctuación, fue de gran ayuda para los genetistas bacterianos. Luria extendió este enfoque para documentar que las mutaciones eran responsables de la resistencia a sulfonamidas en *S. aureus* y Demerec mostró el origen genético de la resistencia a estreptomycin. Así armados con esta prueba, los genetistas bacterianos desafiaron a los bacteriólogos en su propio terreno: la adaptación nutricional (Creager, 2007). A pesar de la aparente contundencia de estos resultados y de los datos cuantitativos que arrojaron, no quedaba claro si el único mecanismo responsable de variación bacteriana y por tanto del origen de la resistencia a antibióticos era mutacional, y si se podía explicar la resistencia sólo desde la selección natural.

La aparición de multiresistencia a antibióticos sembró dudas sobre la explicación mutacional y selección natural como únicos argumentos a este fenómeno, porque si bien podía sugerirse como mutaciones múltiples al azar seleccionadas por una presión ambiental específica, otras opciones eran también plausibles. Las primeras bacterias multiresistentes (*Shigella*) de pacientes con disentería se identificaron en Japón, generando un problema de salud pública serio por el fracaso terapéutico y la diseminación de estos microorganismos (Watanabe, 1963). En 1959 se demostró que la multiresistencia era transferida entre aislamientos de *Shigella* y *E. coli* al combinarlos en cultivo. Esto indujo la pregunta ¿Cómo se llevaba a cabo la transferencia de multiresistencia de un microorganismo a otro?. Para explicar ésta y otras características, Tatum y Lederberg presentaron evidencia de cómo se transfiere horizontalmente información genética entre bacterias por contacto directo. Este resultado controvertiría la explicación de la resistencia antibiótica desde la selección

natural del más apto y retomaría postulados Lamarckianos de adaptación (Lederberg, 1947; Tatum & Lederberg, 1947).

Para esta época ya se aceptaba que la herencia en bacterias dependía de la existencia de genes, pero no era claro si la transferencia de éstos se comportaba igual que en células eucariota y, si las leyes de herencia Mendeliana eran extrapolables a estos microorganismos o, dependían de factores extranucleares como los ya identificados en algunas bacterias y plantas (Lederberg & Lederberg, 1952; Tatum & Lederberg, 1947). Tatum y Lederberg después de una serie de experimentos concluyeron que no era posible hacer una analogía entre la herencia de caracteres bacterianos y, el proceso mendeliano e identificaron un nuevo proceso de transferencia horizontal de información genética el cual se lleva a cabo por contacto directo entre bacterias (conjugación), sin importar su especie e independiente de su replicación.

Tatum y Lederberg se preguntaron luego ¿cómo se llevaba a cabo la transferencia de información genética entre bacterias?. Para responder, partieron de dos cepas distintas de *E. coli* K-12 con diferentes requerimientos nutricionales. Después de sembrarlas juntas durante un tiempo corto y repicarlas a un medio de cultivo mínimo, observaron el crecimiento de bacterias sin ningún requerimiento nutricional (Met+, Bio+, Thr+, Leu+) procedentes del cultivo mixto. La aparición de estas bacterias se debía a recombinación de información, por contacto directo, donde la cepa donante pasaba información genética a la receptora. Este mecanismo de recombinación dependía de un factor extracromosómico, denominado en 1941 por Wright plasmagen en contraste a los genes nucleares y también conocido como factor F (factor de fertilidad), el cual se replica independientemente del cromosoma (Lederberg & Lederberg, 1952; Lederberg, 1952; Tatum & Lederberg, 1947).

Más adelante Davis diseñó otro experimento para someter a prueba el contacto bacteria-bacteria. En este trabajo se inocularon bacterias con diferentes requerimientos nutricionales en un tubo en forma de U, dividido en la mitad por una membrana que permitía flujo de medio de cultivo e impedía paso de bacterias de un compartimento a otro. Davis observó que al inocular las mismas cepas bajo las mismas condiciones, pero sin contacto directo, no era posible obtener bacterias recombinantes sin requerimientos nutricionales, lo que sustentaba la necesidad de contacto directo propuesta por Tatum y Lederberg para la transferencia (Davis, 1950; Hayes, 1952; Tatum & Lederberg, 1947).

Luego Watanabe determinó el papel de plasmagenes en la multirresistencia, encontrando que éstos transferían múltiples genes y se localizaban a nivel citoplasmático; por esta razón los denominó factor R (resistencia), mientras otros investigadores lo llamaron episoma. El análisis de estos elementos evidenció que la transferencia de información genética se llevaba a cabo mediante contacto directo (conjugación). Además, que estos elementos transportaban varios tipos de genes que le proporcionan a las bacterias flexibilidad genética ([Watanabe, 1963](#)).

En 1952 Lederberg propuso cambiar el término de episoma a plásmido, limitando el uso del primero para elementos extracromosomales que se integran al cromosoma. Se reconoció así que los plásmidos juegan un papel importante en la evolución bacteriana, en especial en transferencia de resistencia a antibióticos y patogenicidad. A pesar de esto, durante un tiempo no fueron reconocidos como agentes involucrados en la evolución bacteriana, ya que se creía que ésta resultaba de la replicación bacteriana, es decir por transferencia vertical de información genética. Microbiólogos y genetistas bacterianos se enfocaron en el análisis y caracterización de elementos genéticos extracromosomales involucrados en herencia citoplasmática ([Cohen, 1993](#); [Joshua Lederberg, 1998](#)).

Con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis, la dicotomía de adaptación (Lamarck) versus mutación (Darwin) empezó a disolverse. Los genetistas bacterianos fieles defensores de la teoría de selección natural, empezaron a utilizar los argumentos de adaptación para explicar la herencia citoplasmática. Por esta razón trabajos posteriores se enfocaron en el estudio de plásmidos de resistencia y el papel de la transferencia horizontal en la evolución bacteriana ([Cohen, 1993](#); [Hayes, 1952](#); [Pál, Papp, & Lercher, 2005](#); [Watanabe, 1963](#)).

Las herramientas de análisis genómico desarrolladas para estudios genéticos, demostraron la alta frecuencia de transferencia horizontal de genes entre bacterias; éstas obtienen DNA del ambiente a través de bacteriófagos y plásmidos que sirven como vehículos o directamente por transformación. Este fenómeno de transferencia horizontal tiene un aspecto Lamarckiano, el DNA es adquirido desde el ambiente para que bacterias sometidas a una presión selectiva particular (exposición a antibióticos) se adapten. La transferencia horizontal de genes es un mecanismo esencial para proporcionar plasticidad genética en muchas especies de bacterias. Por tanto, durante la evolución la habilidad de la bacteria para adaptarse a ambientes nuevos, es resultado de la adquisición de genes a través de transferencia horizontal, y alteración

de las funciones de genes pre-existentes a través de mutaciones puntuales y transmisión vertical (Stokes & Gillings, 2011; Sykes, 2010).

Estos experimentos muestran que la evolución de microorganismos antibiótico resistentes, se explica desde dos postulados teóricos, resaltando la exposición ambiental a antibióticos en la generación y diseminación de genes resistencia. A partir de los 60s los estudios se han enfocado en el modo de acción antibiótica y los mecanismos de resistencia. Así, se han identificado más de 15 clases de antibióticos que actúan sobre funciones bacterianas importantes. Estos son agrupados según su estructura química, donde miembros de una misma clase están estrechamente relacionadas y generalmente comparten el mismo sitio de acción, por esta razón, pueden ser sometidos a resistencia cruzada (Walsh, 2003). En respuesta a esto las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia para minimizar la interacción del antibiótico con su sitio de acción (McDermott *et al.*, 2003; Tenover, 2006).

### **1.1.6 Mecanismos de resistencia a antibióticos**

Para explicar mejor los mecanismos involucrados en la aparición y diseminación de resistencia a antibióticos se parte del genoma bacteriano que está compuesto por un cromosoma, donde se encuentra toda la información necesaria para el ciclo de vida de la bacteria, y elementos genéticos extracromosomales. Entre estos últimos se encuentran plásmidos, secuencias de inserción, transposones e integrones, donde se ubican genes que, bajo ciertas circunstancias favorecen supervivencia; ejemplo de éstos son los que confieren resistencia a antibióticos que al expresarse generan tolerancia a éstos fármacos (Lederberg, 2000; Stokes & Gillings, 2011). El cromosoma es heredado verticalmente por los descendientes de la bacteria mientras los elementos genéticos extracromosomales pueden ser transferidos horizontalmente de una bacteria a otra. Por esta razón la resistencia puede ser endógena (innata) resultado de mutaciones en genes cromosomales, o exógena (adquirida) por adquisición de elementos genéticos móviles a través de transferencia horizontal de información genética entre bacterias (Courvalin, 2008b; Depardieu, 2007).

Las mutaciones cromosomales son una vía de resistencia eficiente, y pueden ocurrir en la secuencia de nucleótidos de genes estructurales, blanco de acción de algunos antibióticos. Ejemplos de esto son transcriptasa y rifampicina, topoisomerasa tipo II y quinolonas, proteína ribosomal S12 y estreptomicina. Esta resistencia es

transitoria y modulada por la presencia ambiental del antibiótico. Mutaciones en promotores o módulos de regulación (sistemas de regulación de dos componentes) son conocidas como mutaciones cuantitativas. Los antibióticos generan presión selectiva para mantener bacterias resistentes e inducir transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias. Así, concentraciones subinhibitorias de penicilina aumenta la transferencia de DNA plasmídico de *E. coli* a *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* (Courvalin, 2008b; Herrick, 2014).

La evolución de bacterias sensibles a resistentes se da básicamente por la aparición de microorganismos resistentes o la diseminación de genes de resistencia, aunque la aparición de microorganismos resistentes puede estar influenciada por la diseminación de genes de resistencia. Por tanto, el surgimiento de microorganismos resistentes, es un aspecto particular de la evolución bacteriana y se han identificado 3 niveles de diseminación de resistencia según el vector: bacterias (diseminación clonal), plásmidos (transferencia replicativa) o genes (transposición replicativa).

La magnitud del gasto energético que impone la expresión de un gen de resistencia a la bacteria, aparece como el principal parámetro biológico que influye en su tasa de desarrollo, estabilidad y reversibilidad (Andersson & Hughes, 2010). La expresión de genes de resistencia, genera gasto energético adicional, el cual depende del tipo de resistencia expresada y puede disminuir la capacidad del microorganismo para sobrevivir y reproducirse (Marciano *et al.*, 2007).

Genes de resistencia localizados a nivel cromosomal exigen mayor gasto energético; así, si la bacteria no los necesita deja de expresarlos, o los hace inducibles para un estímulo particular; este es el caso de la resistencia a vancomicina en *S. aureus*, la cual es inducida sólo en respuesta a la presencia de glicopéptidos (Moubareck, 2009), o los cambia de ubicación a plataformas extracromosomales, disminuyendo gasto porque pueden autoreplicarse independientemente sin división celular. En contraste, los genes de resistencia a antibióticos localizados en plataformas móviles de DNA extracromosomal, no generan costo energético, por lo que tienden a mantenerse y expresarse por más tiempo (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011).

De otro lado el fenómeno de co-selección representaría bajo costo energético y por tanto preserva la resistencia. Éste se define como la adquisición y conservación de diferentes genes de resistencia localizados en la misma plataforma, característica común en la resistencia adquirida por transferencia horizontal (Herrick *et al.*, 2014;

[Wellington et al., 2013](#)), constituyéndose en uno de los principales problemas de multirresistencia. Así, el tiempo requerido para reducir la expresión de resistencia a un antibiótico está inversamente relacionado con el costo biológico generado ([Depardieu et al., 2007](#); [Petersen et al., 2009a](#)).

Basándose en estos conceptos de transferencia de resistencia en bacterias y su asociación con la presencia de antibióticos en un medio no hospitalario se estudiaron bacterias resistentes asiladas en una granja porcícola.

## Capítulo 2

# Granja porcícola, Modelo de estudio de la resistencia a antimicrobianos extrahospitalaria

El uso de antibióticos en medicina veterinaria se introdujo desde 1950. Aquí estos fármacos son utilizados para terapia, prevención de enfermedad y promoción de crecimiento (Cromwell, 2002; Marshall & Levy, 2011). Dentro del repertorio de antibióticos usados hay algunos prescritos para tratamiento de infecciones en humanos (Agero, 2010). Como terapia son especialmente utilizados para el tratamiento de infecciones respiratorias y entéricas. Para promoción de crecimiento se dan especialmente durante la primera etapa de la vida animal, en pollos, cerdos y becerros (Aarestrup *et al.*, 2000). Su uso como promotores de crecimiento en dosis subterapéuticas, ha sido asociado con resistencia a antibióticos (WHO/EURO, 2012; Marshall & Levy, 2011; OPS, 2009).

Para sugerir asociación causal entre uso de antibióticos en diferentes ambientes y expresión de resistencia a antibióticos, se han hecho estudios que describen la frecuencia de microorganismos causantes de infección y el perfil de susceptibilidad a antibióticos expresado. En ganado bovino hay pocos estudios; algunos se han centrado en aislados de *E. coli* de microbiota de animales sanos, que son sensibles a la mayoría de antibióticos. Se han identificado tasas de resistencia bajas a sulfametoxazol, tetraciclina, ampicilina y gentamicina (Bettelheim *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2005). En otros se destacan las infecciones como uno de los principales problemas en acuicultura. Las bacterias de importancia en acuicultura son *Aeromonas spp*, *Vibrio spp* y *Pseudomonas spp*. De estas se ha reportado resistencia a algunas penicilinas, cefalosporinas, oxitretaciclinas, tetraciclinas y sulfametoxazol (Alcaide *et al.*, 2005, 2010; Keen & Montforts, 2012; Martinez, 2009).

La industria avícola es una de las más estudiadas, donde los sectores de carne de pollo e industria de huevos son notorios. Los patógenos de interés son *Campylobacter spp*, seguido por *Salmonella spp*. Estudios en *Campylobacter spp* han

reportado resistencia a eritromicina, tetraciclina, ampicilina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina (Aarestrup *et al.*, 2000; Cortés, 2010; Villegas, 2002; Pantosti, 2012) y esta es la bacteria causante de enfermedades transmitidas por alimentos más común (van Gerwe, 2012; Zaidi *et al.*, 2012). El consumo de carne de aves, es la principal fuente de infecciones por *Salmonella spp* en humanos (S. C. Hsu *et al.*, 2006). Sin embargo, la prevalencia de resistencia es más baja que la descrita en cerdos (Agerso, 2010).

*E. coli* se ha utilizado como indicador para evaluar la relación entre la resistencia a antibióticos en pollos e infecciones humanas extra intestinales. Se ha reportado resistencia a estreptomina, sulfatiazol y tetraciclina. En Cali, Colombia un estudio desarrollado por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) caracterizó aislamientos de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina, una fluoroquinolona de segunda generación, en dos granjas avícolas donde utilizaban fluoroquinolonas como promotores de crecimiento, encontrando relación entre el perfil de resistencia expresado y los antibióticos utilizados. Además identificaron resistencia a ciprofloxacina en pacientes ambulatorios y hospitalizados en Cali, sugiriendo que el uso de fluoroquinolonas en animales, puede contribuir a la alta tasa de resistencia a ciprofloxacina en humanos (Villegas, 2002).

Estudios más reciente reportan una relación entre la amplia diseminación de genes de resistencia, el uso de antimicrobianos y resistencia en la industria porcícola. Por ejemplo en cerdos, se han identificado altas tasas de resistencia a estreptomina, tetraciclina, fluoroquinolonas y algunos  $\beta$ -lactámicos y esto se da en diferentes países (Aarestrup, *et al.*, 2008; Hsu, *et al.*, 2006; Quintana-Hayashi & Thakur, 2012; Varga, *et al.*, 2009).

### **Objetivo específico asociado**

Caracterizar el sistema de producción en la granja en estudio, con énfasis en el uso de antibióticos, asociaciones potenciales de resistencia, manejo y distribución de animales, interacciones: animales – trabajadores de la granja - ambiente, y manejo de residuos.

## **Diseño metodológico**

### **1.1.7 Diseño del estudio**

Este fue un estudio descriptivo de corte transversal, el cual se desarrolló en el Laboratorio de Salud Pública de Bogotá, el Laboratorio del grupo de resistencia antimicrobianos, CORPOICA y en el Laboratorio de Biofísica, CIF-Universidad Nacional de Colombia. Se seleccionó como modelo de estudio una granja de producción de cerdos, sistema analizado por la alta tasa de resistencia a antibióticos reportada en otros estudios (Varga, *et al.*, 2009) y además por ser una de las cadenas productivas menos estudiadas para el análisis de resistencia a antimicrobianos en el país.

La granja de cerdos seleccionada está ubicada en Choachí, Cundinamarca, municipio que está entre los principales productores de carne de cerdo del departamento, y que abastece las plantas de beneficio San Martín y Guadalupe de Bogotá, principales punto de venta de carne.

### **Población de estudio**

Animales de producción (cerdos), trabajadores y muestras ambientales (residuos de corral, hisopo de arrastre de suelo y concentrado) de la granja porcícola donde utilizan antibióticos para tratamiento y prevención o profilaxis de enfermedades.

### **1.1.8 Recolección de datos**

Para esto se realizaron encuestas (Anexo 1 y 2), que buscaron información sobre la granja, su organización, número de animales, tipo de alimentación, fuentes de abastecimiento de agua y uso de antimicrobianos (Anexo 1 y 2). Además se hizo una entrevista no estructurada (ver tabla 1) al médico veterinario y al administrador para ampliar la información de las encuestas, donde se incluyeron datos asociados con tiempos y desarrollo de los ciclos de producción, prácticas de bioseguridad, antimicrobianos utilizados, conocimiento sobre el uso de antibióticos y resistencia a antimicrobianos, abastecimiento de agua, limpieza, manejo y eliminación de residuos orgánicos.

## Resultados

### Datos de las encuestas

Según la información diligenciada por el médico veterinario y el administrador de la granja en la encuesta y entrevista los datos recuperados se relacionan en la [tabla 1](#).

**Tabla 1.** Información recuperada de la encuesta aplicada a trabajadores y administrador de la granja

Categorías Analizadas	Resultados dados
Identificación e información general de la granja	Municipio: Choachí, Cundinamarca Vereda: Potrero Grande Altura de la granja: 2100 msnm Raza de cerdos: F1 Nivel de bioseguridad: 3
Animales de la granja	Número de cerdos en la granja: 925 Número de corrales: 108 corrales, 7 módulos y 18 canales Origen de los cerdos: Natalidad de la granja Operaciones mixtas en alojamiento separado: 3 Bovinos de leche 10 bovinos de carnes 1 ternero 6 gallinas
Manejo de la granja	Alimento que consumen los cerdos: Concentrado Itacol para iniciación, levante, engorde, ceba y cría. Tipo de piso de los corrales: concreto, con división Desagüe de desechos en los campos
Información del agua de la granja	Tipo de fuente de agua para beber en la granja: Pozo profundo y acueducto comunitario, no se realiza desinfección del agua Tipo de fuente de agua para beber en la casa: acueducto comunitario, no se realiza desinfección del agua
Desinfectantes usados en instalaciones y equipo	Hipocloritos yodados Amonio cuaternario Calor seco
Antimicrobianos utilizados	Antimicoplásmicos: Macrólidos (Tilosina), Clortetraciclina y Pleuromutilinas (tiamulina)  Antibióticos de amplio espectro: cefalosporinas de tercera generación (ceftiofur), oxitetraciclina, amoxicilina, quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina)

Durante este trabajo se hicieron dos encuestas. La primera buscó información general de la granja, capacidad total, operación mixta de animales, organización y proceso productivo. Información asociada con antimicrobianos se

exploró mediante preguntas encaminadas a entender procesos de limpieza y desinfección y listado específico de antibióticos. Este último, sesgó la respuesta sobre estos fármacos porque si no aparecía en el listado no era considerado. De los datos recolectados, es claro el uso de antibióticos y desinfectantes (antimicrobianos), con diferentes propósitos (profilaxis, limpieza y tratamiento), así como la distribución y cuidado diferencial de animales. La administración de antibióticos más importante se asocia con promoción de crecimiento, si bien es presentada como profilaxis.

La segunda encuesta se diseñó conociendo los datos de la primera y se enfocó en profundizar aspectos relacionados con uso de antimicrobianos. Así, se hicieron preguntas abiertas concretas de uso de antibióticos, tipos y frecuencia, dirigidas al médico veterinario y trabajadores para indagar sobre su conocimiento de resistencia antibiótica. Por ejemplo, se preguntaba el nombre de los antibióticos administrados, qué entendían por resistencia a antibióticos y dónde los obtienen. Para establecer mejor su uso para tratamiento se indagó sobre infecciones en la granja y la forma de tratarlas. Se confirma el uso de antibióticos.

## **Datos de la entrevista**

De la información proporcionada por el médico veterinario y el administrador de la granja en la entrevista se encontró que ésta, cuenta con tres trabajadores de tiempo completo y dos ayudantes, para un total de cinco personas en contacto directo y permanente con los animales. Con la información dada en la entrevista, se generó una representación gráfica (Figura 1) del proceso de producción y la distribución de la granja, que se describe a continuación.

## **Organización, tiempos y desarrollo de los ciclos de producción**

La granja está dividida en 5 áreas según el proceso de producción, el cual inicia desde la monta hasta la planta de beneficio. En el área de servicio y montas, donde están los cerdos reproductores (5 machos) se da la fecundación. De allí las hembras pasan al área de gestantes y se distribuyen



La granja ha implementado las barreras recomendadas para prevenir entrada y diseminación de agentes infecciosos, controlando el ingreso, salida y movimiento interno de animales, personal y productos. Además han implementado registros de las actividades desarrolladas en las áreas de producción con el objetivo de controlar procesos y el comportamiento de la granja.

Los registros se diligencian por área en formatos desarrollados en la granja, donde relacionan datos de los animales como edad, peso, horario de alimentación y datos del área asociados con temperatura, humedad, limpieza y desinfección. Esta información es diligenciada por el trabajador de turno y verificada por el administrador.

### **Antimicrobianos utilizados, tipos de uso, conocimiento sobre el uso de antibióticos y resistencia a antimicrobianos.**

Tabla 2. Antimicrobianos utilizados en la granja, relacionados por uso y animales

Presentación	Compuesto activo	Uso reportado	Tipo de animales
Excede-ceftiofur	Ceftiofur <sup>5</sup>	Profilaxis	Lechones recién nacidos
Cefexim	Ciprofloxacina <sup>6</sup>	Profilaxis	Lechones recién destetados
Negasunt	Sulfamida	Profilaxis	Lechones de 5 a 6 días post-castración
Calibiótico	Amoxicilina	Tratamiento	Hembras con mastitis y/o problemas uterinos
Tilosina	Macrólido	Tratamiento	Hembras con mastitis
Enrover	Enrofloxacin <sup>9</sup>	Tratamiento	Animales con Infecciones del aparato digestivo
Oxitetraciclina	Oxytetraciclina	Tratamiento	Hembras con mastitis y animales con problemas respiratorios

Los antimicrobianos reportados en la entrevista como utilizados en la granja se relacionan en la tabla 2. El registro de administración de antibióticos a animales se ejecuta marcando el cerdo correspondiente y registrando la camada, pero no se lleva control escrito de dosis y tiempos de administración. La decisión de suspender alguno de estos fármacos es por observación y para tratamiento el curso se da completo.

En cuanto al conocimiento y usos, se indagó sobre la utilidad de los antimicrobianos reportados, tanto al médico veterinario como al administrador

<sup>5</sup> Cefalosporina de tercera generación

<sup>6</sup> Quinolonas

de la granja, quienes indican que son utilizados para tratamiento y prevención de enfermedades, pero no reportan su uso como promotores de crecimiento. Se realizó esta misma pregunta al resto de los trabajadores pero tienen muy poca información con respecto a antimicrobianos y resistencia

Al profundizar en el conocimiento sobre qué es un antibiótico, la definición más común es que estos son utilizados para matar algunos microorganismos que causan enfermedades. Uno de los trabajadores lo define como un compuesto de penicilina. En cuanto al concepto de resistencia a antibióticos la respuesta fue diferente de un trabajador a otro; algunos la definieron como la capacidad de los microorganismos de resistir el efecto del antibiótico, otros como un antibiótico que no funciona como debe ser o que no tolera los antibióticos, lo que muestra la falta de información acerca de esta problemática en la granja.

Los medicamentos utilizados en la granja los adquieren en establecimientos comerciales, sin prescripción para su compra en la mayoría de oportunidades. Se indagó además sobre la exposición del personal a otros antibióticos y reportaron haber utilizado alguno en el último año para tratamiento de sus enfermedades. Por trabajador (T) se documentó: T1: amoxicilina, T2 diclofloxacina y amoxicilina, T3 amoxicilina y penicilinas, T4 amoxicilina. En general se identificó un amplio uso de  $\beta$ -lactámicos en este grupo.

El número de episodios de infecciones reportados en la granja, al año se describen en la [tabla 3](#).

**Tabla 3.** Número de infecciones al año, tratamiento y medicamentos utilizados

<b>Infección</b>	<b>Episodios sin tratamiento</b>	<b>Episodios con tratamiento</b>	<b>Medicamentos utilizados</b>
Mastitis	10-15		
Enfermedades después del parto		30	Amoxicilina
Infecciones después de la castración		10	Tripén (Penicilina Procaínica, Penicilina Benzatínica, Penicilina Potásica)
Enfermedades respiratorias		Muchas	Tilosina Veterflucina (Penicilina procaínica, estreptomycin, flumetasona)
Diarrea		24-36	Enrofloxacin

Infecciones de piel		10	Penicilina
Otras			

El uso, concentración y tiempo de administración de estos antibióticos fue definido por el médico veterinario de la granja, o por recomendaciones de las casas comerciales. Se detectó que las instrucciones de dosificación no son siempre seguidas como se prescribieron y los cursos de estos fármacos terminan antes o las dosis utilizadas son la mitad de la recomendada asumiendo que estas prácticas minimizan el uso excesivo de antibióticos. Más aún, se administran premezclas de concentrado que incluyen algunos antimicrobianos como tiamulina<sup>7</sup>, pero hay desconocimiento sobre otros antimicrobianos en el alimento, cantidad o su concentración. Las premezclas llegan a la granja, recomendadas por encargados de las empresas de alimentos<sup>8</sup> dependiendo del requerimiento asociado.

### **Abastecimiento de agua, limpieza, manejo y eliminación de residuos orgánicos**

El agua utilizada para producción proviene de pozo profundo y no es sometida a ningún proceso de desinfección. Para consumo humano utilizan un acueducto comunitario que se alimenta de una vertiente natural, pero el personal desconoce si tiene algún tipo de tratamiento.

La limpieza general se lleva a cabo los miércoles, cada vez que los animales son movilizados para limpieza de un corral a otro. Un corral queda libre en el proceso el cual es desinfectado con un derivado de amonio cuaternario e hipoclorito. El aseo inicia con la recolección de residuos orgánicos de los corrales de las diferentes áreas, los cuales se depositan en un sitio asignado para secado al aire libre, almacenamiento y procesamiento para

<sup>7</sup> un antibiótico semisintético derivado de pleuromutilina, con espectro amplio y de uso en animales de granja

<sup>8</sup> Itacol o Auropharma. En la página web de Itacol no mencionan mezcla con antimicrobianos. Auropharma referencia un listado de premezclas algunas con antimicrobianos incluidos.

venta y uso. Este proceso permite su uso posterior como abono o compost, en cultivos de frutas y hortalizas entre las que se cuentan frijol, maíz y cebolla que son regados con agua de la quebrada local y consumidos en la vereda.

Las partículas de materia orgánica son removidas por corriente de agua, (eliminadas a campo abierto) para evitar la inactivación del desinfectante por exceso de residuos orgánicos. Por último aplican hipoclorito, yodo o amonio cuaternario en la superficie lavada. Los residuos son eliminados a campo abierto donde permanecen otros animales como vacas lecheras, bovinos para producción de carne, terneros y pollos para consumo en la granja. Los residuos orgánicos de corral pueden llegar a fuentes de agua cercanas. Si como se describe a continuación estas incluyen bacterias resistentes y restos de antibióticos, esto implica llegada y acumulación de estos en el ambiente.

### **Conclusión**

La granja en estudio está clasificada como un sistema de producción de ciclo completo, semitecnificada por el número de animales e infraestructura. En ella se identificó uso de antibióticos para tratamiento y profilaxis, en especial  $\beta$ -láctamicos, quinolonas y sulfamidas. Así mismo para desinfección de superficies utilizan amonio cuaternario e hipoclorito.

Se identificó como principal fuente de contaminación y diseminación potencial de bacterias resistentes y restos de antibióticos, los residuos orgánicos de los corrales de pre-ceba y ceba, donde los animales están expuestos a un mayor número de antimicrobianos. Otro punto crítico de contaminación es el ambiente donde son eliminados los residuos de lavado de los corrales. Más aún, es importante resaltar que en el suelo hay bacterias ambientales que estarían expuestas a los antibióticos eliminados por excretas, lo que favorecería la adquisición de determinantes de resistencia que pueden diseminarse en la comunidad.

# Capítulo 3

## Resistencia a antimicrobianos en la granja de estudio

### Microorganismos en estudio

#### *Escherichia coli*

Bacteria Gram negativa que pertenece al género *Escherichia* denominada así en honor a Theodor Escherich, quien fue el primero en aislar esta bacteria de heces de un niño en 1885. Es miembro de la familia Enterobacteriaceae, en la cual se clasifican bacterias entéricas<sup>9</sup>. Este microorganismo es parte de la microbiota gastrointestinal de humanos y animales. Se puede encontrar en diferentes ambientes, como suelo, agua (contaminación fecal) y en organismos vivos como plantas, animales y personas. En algunas ocasiones puede ser considerado patógeno o causante de infecciones en animales y humanos ([Manning, 2010](#)).

*E. coli* patógena se clasifica según el tipo de enfermedad que cause; se han identificado 6 grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D y E). Una de las principales características de este microorganismo es la amplia diversidad de genotipos que causan enfermedad; estos genotipos y sus habilidades para causar enfermedad llevan a categorizar esta bacteria según sus patotipos, de los cuales hay 6 intestinales y 2 extra intestinales. Entre los intestinales están *E. coli* enterotoxigénica (ECET), enteropatogénica (ECEP), enterohemorrágica (ECEH), enteroadherente (ECEA), enteroinvasiva (ECEI) y enteroagregativa (ECEA), y son causa frecuente de diarrea en animales y humanos. Los extraintestinales se asocian con meningitis (ECAM) o son uropatogénicos (ECUP) ([Johnson, et al., 2016](#); [Martin Dworkin, 2006](#)).

*E. coli* uropatogénica, está asociada con infecciones de tracto urinario (ITU), las cuales afectan a personas de todas las edades, aunque son más comunes en mujeres; esto puede ser por diferencias anatómicas, uretra más pequeña y distancia

---

<sup>9</sup> bacterias que sobreviven en el tracto gastrointestinal

entre tracto gastrointestinal y genitourinario más corta, lo que haría más fácil el paso de esta bacteria, del intestino al tracto urinario. ECUP posee varios genes de virulencia, lo que le permite adherirse (colonizando) a membranas mucosas, evitar la respuesta inmune del hospedero, producir toxinas y otros factores que desencadenan la patología.

Los genes de resistencia, virulencia y grupo filogenético en estas bacterias cambian según el reservorio donde se encuentre dicha bacteria; si hace parte de la microbiota gastrointestinal de animales o humanos, o si son causantes de alguna patología. Sin embargo, en estudios recientes se han identificado los mismos genes en *E. coli* aislada de fuentes animales y humanas (Bettelheim, *et al.*, 2003; Varga, *et al.*, 2009), lo cual puede indicar la transmisión de estas bacterias o de elementos genéticos entre animales y humanos (Fernández-Alarcón, *et al.*, 2012; Hsu, *et al.*, 2006). A partir de aislados de este microorganismo se describió por primera vez la capacidad de transferir horizontalmente genes de multi-resistencia. Los genes de resistencia más importantes en estos microorganismos son  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y a fluoroquinolonas. Se ha asociado esta relación de resistencia, con la plataforma genética en la que se localizan, aumentado su transmisibilidad entre diferentes bacterias.

En *E. coli* causante de infecciones del tracto urinario se ha identificado resistencia con mayor frecuencia a ampicilina, sulfonamidas y cefalosporinas de tercera generación, datos similares a lo descrito para esta especie de la microbiota gastrointestinal de cerdos resistentes a tetraciclina, ampicilina, sulfonamidas, trimetropin sulfametoxazol, espectinomicina y estreptomycin (Agerso, 2010).

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva del género *Staphylococcus*, denominada así porqué se ordena en grupo o racimos; es miembro de la familia Micrococcaceae, en la cual se clasifican bacterias de forma esférica; este microorganismo es parte de la microbiota de piel y mucosas humanos y animales. Si las condiciones de crecimiento no son favorables, *S. aureus* puede mantenerse por años en estado latente, resultado de su pared celular, la cual es muy gruesa en comparación con la de otras bacterias, lo que hace más difícil la entrada de antibióticos a su interior (Dworkin, 2006).

Puede causar infecciones en piel, tracto urinario y asociadas a atención en salud como neumonías, infecciones en heridas, bacteriemia y sepsis. Produce factores de virulencia que permiten ataque a células del hospedero y evita la respuesta del sistema inmune. Algunas infecciones causadas por este microorganismo responden a tratamiento, pero otras cepas son resistentes a antibióticos; cerca de 90% son resistentes a penicilina. Para superar esta resistencia se han diseñado medicamentos químicamente modificados, como meticilina, antibiótico al que también es tolerante (Freeman-Cook & Edward, 2005).

Las infecciones por *S. aureus* son resistentes a múltiples antibióticos en especial penicilina, meticilina, tetraciclina, eritromicina y en menor proporción a vancomicina. El tipo de cepa causante de infecciones en humanos y animales hace parte del complejo clonal CC398, que ha sido identificado en animales, particularmente cerdos y ha afectado personas en contacto directo con dichos animales (Agero, 2010; Baquero, 2012; Benito *et al.*, 2015).

### ***Enterococcus spp***

Los *Enterococcus spp* son un complejo grupo de bacterias, que hacen parte de la microbiota gastrointestinal de animales y humanos, constituyen 1% de esta, y también están en otros ambientes como suelo, agua y alimentos. Además son una de las principales causas de infecciones nosocomiales, del tracto urinario, heridas quirúrgicas y endocarditis en humanos. Las especies de importancia clínica son *E. faecium* y *E. faecalis* siendo este último el causante de 90% de infecciones por *Enterococcus spp* (Daniel, *et al.*, 2015).

*Enterococcus spp* es una de las bacterias indicadoras de contaminación fecal en alimentos y agua para consumo humano. Tienen la capacidad de adquirir una amplia variedad de factores de resistencia a antimicrobianos por intercambio horizontal de material genético móvil, lo que puede generar problemas en el manejo de infecciones en humanos portadores de estas cepas multirresistentes.

### ***Salmonella spp***

Es un patógeno zoonótico importante con una gran significancia económica en animales y humanos. Es reservorio común de tracto gastrointestinal de animales domésticos y salvajes, y su transmisión a humanos se da frecuentemente a través de

comida y otros factores que favorecen contaminación como temperatura de almacenamiento del producto final, o cocción inadecuada y contaminación cruzada con comida lista para consumo. En la Unión europea *S. enteritidis* y *S. typhimurium* son los serovares más asociados con enfermedad en humanos. *S. enteritidis* está asociada con consumo de huevos contaminados y carne de pollo, mientras *S. typhimurium* con consumo de carne de cerdo, pollo y res. La diseminación de *Salmonella spp* resistente a antibióticos se ha relacionado con la diseminación clonal del tipo DT104, resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina ([DANMAP, 2014](#)).

### **Objetivos Específicos asociados**

- Adquirir, recuperar y aislar bacterias de muestras de animales, trabajadores de la granja y ambiente
- Establecer el perfil de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos logrados y discriminados por fuente de origen (antibiogramas)

### **Diseño metodológico**

#### **1.1.9 Cálculo de la muestra:**

El cálculo de la muestra se realizó teniendo en cuenta el total de animales disponibles durante el muestreo, con el paquete estadístico Epi-info 7.1.3, metodología para estudios descriptivos, con los siguientes parámetros: frecuencia de resistencia a antimicrobianos desconocida 50%, error absoluto 5%, nivel de confianza 95%, tamaño de la población en el momento del muestreo: 650, total de animales a muestrear: 241.

#### **1.1.10 Recolección de muestras**

Se tomaron muestras de hisopado rectal y nasal de trabajadores, animales, y muestras ambientales de los corrales (residuos de suelo, hisopado de arrastre de corral y concentrado) de la granja en estudio ([Figura 2](#)).



Figura 2. Toma de muestras en la granja en estudio

Se recolectaron 241 hisopados rectales de animales, los cuales se procesaron por corral mientras que los hisopados de animales que estaban en un mismo corral se analizaron en grupo (tabla 4) para un total de 107 muestras, que incluyeron 64 hisopados rectales de animales, 4 de trabajadores, 39 muestras ambientales (8 muestras de concentrado según etapa productiva, 17 muestras de residuos de suelo de los corrales de pre ceba y ceba, 14 muestras de arrastre de ceba y pre-ceba).

Tabla 4. Número de animales, muestras analizadas y tipo de muestras recolectadas

Áreas	N° animales analizados		Tipo de muestras	Muestras analizadas	N° HN
	AM	AN		AM-AN	
Machos	0	5	Hisopado rectal (HR) e Hisopado nasal (HN)	5	5
Gestantes	0	30	HR y HN	30	30
Partos	1	12	6 HR y HN cerdas, 6 <i>pools</i> de HR (5 por corral), 30 HN de cerditos (5 por corral), 1 concentrado	13	36
Pre-ceba	7	16	7 <i>pools</i> de HR (10 por corral), 10 HN por corral, 1 de residuos por corral, 1 arrastre por corral, 2 muestras de concentrado	23	70
Ceba	10	23	10 <i>pools</i> de HR (10 por corral), 10 HN por corral, 1 de residuos por corral, 1 de arrastre por corral, 3 muestras de concentrado	33	100
Trabajadores	4	0	4 HR y HN	4	4
<b>Total</b>	<b>241</b>			<b>107</b>	<b>241</b>

## Adquisición, recuperación y aislamiento de bacterias de muestras de animales, trabajadores y ambiente de la granja

Se analizaron 107 muestras en total de las cuales 64 fueron hisopados rectales así, 41 de animales en corrales individuales machos, gestantes y cerdas en lactancia, 23 *pools* de hisopados rectales (5-10 muestras por *pool* según el número de animales por corral) de las áreas de parto, pre-ceba y ceba dónde los animales comparten corral; 4 hisopados rectales de trabajadores de la granja y por último 39 muestras ambientales (8 muestras de concentrado según etapa productiva, 17 muestras de residuos de suelo de los corrales de pre-ceba y ceba, 14 muestras de arrastre de ceba y pre-ceba).

### Bacterias analizadas

Según las recomendaciones y análisis hechos por la DANMAP (DANMAP, 2014), se seleccionaron como microorganismos de análisis *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*

(indicadores) y *S. aureus* y *Salmonella spp* (patógenos), de interés en salud pública por ser causa frecuente de enfermedades infecciosas y presentar alta tasas de resistencia a antibióticos. Las 107 muestras de hisopados rectales y muestras ambientales de corral fueron procesados para recuperar *E. coli*, *Enterococcus spp* y *Salmonella spp*. Los 241 hisopados nasales se procesaron para recuperar *S. aureus*. Los hisopados nasales (HN) y rectales (HR) tomados se recolectaron en medio de transporte Cary Blair, las muestras ambientales: muestras de arrastre, materia fecal, y concentrado se almacenaron en bolsas estériles.

Los hisopados rectales (procesados en *pool* por corral) y muestras ambientales se cultivaron en 20 mL de agua peptonada bufferada (BPW) para pre-enriquecimiento bacteriano. Los hisopados nasales se cultivaron en 2 mL de caldo BHI a 37°C por 24 horas.

El aislamiento e identificación de los microorganismos seleccionados se realizó en el Laboratorio de resistencia a antimicrobianos de CORPOICA. Para la recuperación de *E. coli* se tomó 1 mL de las muestras pre-enriquecidas en agua peptonada y cultivaron en 5 mL de caldo EC, se incubaron a 37 °C por 24 horas; con asa calibrada se sembraron 10 uL del caldo EC en agar Mac Conkey, se incubaron a 37 °C por 24 horas, se seleccionaron la colonias presuntivas de *E. coli* y confirmaron mediante las pruebas bioquímicas sulfuros, indol y motilidad (SIM). Para la recuperación de *Enterococcus spp* se tomó 1 mL de las muestras pre-enriquecidas en agua peptonada y cultivaron en 5 mL de caldo Enterococcosel, se incubaron a 37 °C por 48 horas; con asa calibrada se sembraron 10 uL del caldo en agar Enterococcosel a 37 °C por 48 horas. Se seleccionaron las colonias presuntivas de *Enterococcus* y se repicaron en agar Slanetz y Bartley. Las colonias presuntivas se confirmaron mediante la prueba de arabinosa.

Para la recuperación de *Salmonella spp* se tomaron 10 0uL y 500 uL de BPW en caldo Rapaport y tetratoniato respectivamente, todas las muestras sembradas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Con asa calibrada se sembraron 10 uL de cada caldo en una caja de Petri con agar XLT4 y HK, se incubaron a 37 °C por 24 horas, se seleccionaron las colonias presuntivas y confirmaron mediante las pruebas bioquímicas lactosa, producción de gas y H<sub>2</sub>S (TSI). Por último, para la recuperación de *S. aureus* se sembraron 10 uL de caldo BHI con asa calibrada en agar Baird Parker y Salado manitol, se seleccionaron las colonias presuntivas y confirmaron por equipo automatizado. La confirmación de género y especie de las bacterias recuperadas se

realizó en el área de microbiología del Laboratorio de Salud Pública de Bogotá con los sistemas de microbiología automatizados Phoenix<sup>TM</sup> y Vitek®.

Estos sistemas hacen identificación rápida de bacterias. El sistema Phoenix utiliza indicadores colórimétricos y fluorimétricos para la identificación (ID), con un panel compuesto de 51 pocillos, de los cuales 45 tienen sustratos bioquímicos liofilizados y 2 controles fluorescentes. Los paneles se inoculan con una densidad de organismo seleccionado equivalente al patrón 0,5 de McFarland, preparando las suspensiones con un nefelómetro BBL<sup>TM</sup> Crystal Spec<sup>TM</sup> o BD Phoenix Spec. Una vez inoculados, se colocan en el instrumento y se incuban a 35 °C, y éste analiza las muestras cada 20 minutos. Para identificación se utilizan una serie de pruebas bioquímicas, que se basan en la utilización y degradación de los sustratos específicos detectados mediante diversos sistemas de indicadores. La producción de ácido se detecta mediante un cambio en el indicador rojo fenol cuando una bacteria utiliza carbohidratos; los sustratos cromogénicos producen coloración amarilla como consecuencia de la hidrólisis enzimática de compuestos p-nitrofenol o p-nitroanilida. La hidrólisis enzimática de los sustratos fluorogénicos produce liberación de un derivado fluorescente de la cumarina. Los organismos que utilizan una fuente específica de carbono reducen el indicador basado en resazurina. Además existen otros *tests* que detectan la capacidad de un organismo para hidrolizar, degradar, reducir o utilizar de otro modo un sustrato (BD Phoenix<sup>TM</sup>, 2008).

### **Perfil de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos logrados y discriminados por fuente de origen (antibiogramas)**

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos se realizaron en paralelo con la confirmación de género y especie en los equipos automatizados antes mencionados. El método de sensibilidad a antibióticos (AST) del sistema Phoenix es un *test* de microdilución que utiliza un indicador rédox para detectar el crecimiento de organismo en presencia de un antibiótico. Se utilizan mediciones continuas de los cambios del indicador, así como la turbidez para determinar el crecimiento bacteriano. Cada panel de sensibilidad tiene diversos antibióticos con un amplio rango de concentraciones.

La definición clínica de resistencia a antibióticos está basada en puntos de corte de la concentración mínima inhibitoria (CMI), definidos por CLSI y EUCAST establecidos en Estados Unidos y en Europa respectivamente. Estos se establecen

basados en la probabilidad de falla terapéutica, información utilizada para la elección de antibióticos en el tratamiento de enfermedades.

Con el fin de analizar y detectar genes y mecanismos de resistencia de ambientes no clínicos, EUCAST propone el uso de puntos de corte epidemiológicos denominados (ECOFFs) para la caracterización de nuevos genes de resistencia a antimicrobianos. Por esta razón para el análisis de susceptibilidad a antimicrobianos en este estudio se usaron los valores ECOFFs

(<http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=162>).

## Resultados

Las muestras se tomaron al azar en las diferentes áreas, distribuidas de la siguiente manera (tabla 5):

Tabla 5. Número de animales disponibles en el momento del muestreo y animales analizados por área

Área	Nº de animales en el muestreo	Nº de animales muestreados
Montas	5	5
Gestantes	60	30
Partos	66	36
Pre-ceba	244	70
Ceba	275	100
<b>Total</b>	<b>650</b>	<b>241</b>

Para evaluar contaminación ambiental se tomaron muestras de residuos de suelo de los corrales (residuos orgánicos, y/o hisopado de arrastre) en las áreas de pre-ceba y ceba, donde había mayor número de animales y eliminación de residuos orgánicos. Además se tomaron muestras de las diferentes clases de concentrado utilizados según la etapa de crecimiento.

Se analizaron 107 muestras en total de las cuales 64 fueron hisopados rectales, así: 41 de animales en corrales individuales (machos, gestantes y cerdas en lactancia), 23 *pools* de hisopados rectales (5-10 muestras por *pool* según el número de animales por corral) de las áreas de parto, pre-ceba y ceba dónde los animales comparten corral y donde se dio prioridad a la detección de resistencia; 4 hisopados

rectales de trabajadores y por último 39 muestras ambientales (8 muestras de concentrado según etapa productiva, 17 de residuos de suelo de los corrales de pre-ceba y ceba, y 14 de arrastre de pre-ceba y ceba).

En estas muestras se evaluó la presencia de *Salmonella spp* como patógeno, *E. coli*, *E. faecium* y *E. faecalis* como bacterias indicadoras. Los aislamientos recuperados fueron 104/107 de *E. coli* (97,1 %), 32/107 (29,9%) *E. faecalis*, 15/107 (14%) *E. faecium*, 0/107 (0%) de *Salmonella spp*. Con respecto a *Staphylococcus spp* se recuperaron 25/241 (9,64%) de los hisopados nasales analizados, de los cuales sólo 5/241 (2,1%) fueron identificados como *S. aureus* recuperados del área de cerdas gestantes (tabla 6).

Tabla 6. Número de aislamientos recuperados por muestras analizadas, género y especie identificados

Muestra	Muestras recuperadas	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>S. aureus</i>
HR-A	41	41	6	13	0	0
PHR	23	23	9	0	0	0
HR-T	4	4	2	0	0	0
RC	17	17	7	0	0	0
HA	14	14	6	1	0	0
CA	8	5	2	1	0	0
HN	0	0	0	0	0	5
<b>Total n (%)</b>	<b>107 (100)</b>	<b>104 (97)</b>	<b>32 (30)</b>	<b>15 (14)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>5(2,1)</b>

HR: hisopado rectal, A: animales, PHR: pool hisopado rectal, T: Trabajadores, RC: Residuos de corral, HA: hisopo de arrastre, CA: concentrado de animales, HN: hisopado Nasal

### Confirmación género y especie de *E. faecium* y *E. faecalis* por PCR

Debido a las inconsistencias en la identificación género-especie para *Enterococcus spp* detectadas en los resultados de secuenciación, se confirmaron todos los aislamientos de *Enterococcus spp* por amplificación de un fragmento del gen *ddl* que codifica para la D-Ala-D-Ala ligasa presente solo en *E. faecium* y *E. faecalis*, siguiendo la metodología propuesta por. (Depardieu et al , 2004) La lista de primers, temperatura de anillamiento utilizados y el tamaño del producto de amplificación se describen en la tabla 7

Tabla 7 . Iniciadores para confirmación de género y especie en aislamientos de *Enterococcus spp*

Iniciadores para confirmación de género y especie de los aislamientos de <i>Enterococcus spp</i>						
Iniciadores	Secuencia (5' - 3')	Gen	Tm	Primers [uM]	Tamaño [pb]	Referencia
DD 13 (+)	CACCTGAAGAAACAGGC	<i>ddl</i>	54	0,2	475	(Depardieu et al., 2004)
DD3-2 (-)	ATGGCTACTTCAATTTACAG	<i>E. faecalis</i>		0,2		
FAC1-1(+)	GAGTAAATCACTGAACGA	<i>ddl</i>	54	0,2	1091	
FAC2-1(-)	CGCTGATGGTATCGATTCAT	<i>E. faecium</i>		0,2		

Los resultados de la confirmación por PCR muestran la imprecisión del sistema automatizado para la identificación de *Enterococcus spp*, los 32 aislamientos identificados como *E. faecalis* fueron confirmados por PCR, pero de los 15 aislamientos de *E. faecium* solo 2 se confirmaron, los 13 restantes fueron identificados como *E. faecalis* tabla 8.

Tabla 8. Número de aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium* identificados por equipo automatizado y confirmados por PCR.

Microorganismo	equipo automatizado	PCR
<i>E. faecalis</i>	32	45
<i>E. faecium</i>	15	2
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>47</b>

### Perfil de susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos logrados y discriminados por fuente de origen (antibiogramas)

A continuación se describen los resultados de susceptibilidad a antibióticos por microorganismo, tipo de muestra y área.

## Resistencia a antibióticos en *E. coli*

Tabla 9. Proporción y porcentaje de resistencia a antibióticos en *E. coli* por área y tipo de muestra

Número de cepas de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos por área											
Familia de antibióticos	Antibiótico	Montas	Gestantes	Partos		Pre-ceba		Ceba		T	Total
		(n=5)	(n=30)	(n=13)		(n=23)		(n=29)		(n=4)	(n=104)
		AN	AN	AN	AM	AN	AM	AN	AM	HR	# / %
<b>β-lactámicos</b>	Amoxicilina /clavulanato	0	0	3	0	0	0	0	0	2	5 (5)
	Ampicilina	0	5	3	0	13	11	6	14	3	50(48)
	Aztreonam	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3(3)
	Cefalotina	1	16	10	1	5	8	5	16	3	65(63)
	Cefepime	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1(1)
	Cefoxitina	0	0	3	0	3	0	0	0	1	7(7)
	Ceftazidime	0	0	3	0	1	0	0	0	0	4(4)
	Cefuroxima	0	0	3	0	1	0	0	0	0	4(4)
	Ceftriaxona	0	0	3	0	3	0	0	0	0	6(6)
	Piperacilina /tazobactam	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4(4)
Ampicilina /Sulbactam	0	0	0	0	10	0	0	3	0	12(12)	
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacina	1	2	0	0	11	0	2	3	0	19(19)
	Levofloxacina	0	1	0	0	3	0	2	3	0	9(9)
<b>Polimixinas</b>	Colistin	5	24	9	0	20	0	10	18	0	86(83)
<b>Aminoglicósidos</b>	Gentamicina	0	0	0	0	5	0	0	1	0	6(6)
<b>Nitrofuranos</b>	Nitrofurantoina	0	1	1	0	1	0	2	2	0	6(6)
<b>Tetraciclinas</b>	Tigeciclina	0	1	0	0	3	0	1	2	0	7(7)

<b>Inhibidores de folato y sulfonamidas</b>	Trimetropin	4	8	4	1	5	0	3	9	2	33(33)
---	-------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--------

AN: animales, AM: ambiente, HR: hisopado rectal, T: Trabajadores

Cómo se observa en la [tabla 9](#), en los 104 aislamientos *E. coli* recuperados se identificó resistencia a colistin en 83% (86/104) en todas las áreas de la granja en estudio. Este antibiótico no fue relacionado dentro del listado de antimicrobianos utilizados en la granja, pero se ha reportado como uno de los más utilizados en producción animal ([Malhotra-Kumar et al., 2015](#)), en especial en combinación con tiamulina para tratamiento y control de enfermedades respiratorias y gastrointestinales. El médico veterinario reportó el uso de pre-mezclas de alimento que podría ser la fuente de presión para la selección de esta resistencia.

La resistencia a ampicilina y cefalotina se encontró en todas las áreas de la granja, 34 y 56% respectivamente, en aislamientos de la microbiota de animales, excepto en el área de pre-ceba donde además se encontró en muestras ambientales. Así mismo, 3/5 aislamientos de trabajadores de la granja son resistentes a estos antibióticos. Esta resistencia puede estar relacionada con el uso de  $\beta$ -lactámicos en la granja y la presión antibiótica generada por la eliminación de la forma activa del antibiótico por orina, o los tratamientos recibidos en el último año.

40% (51/104) de los aislamientos de *E. coli* fueron resistentes a trimetropin sulfametoxazol, el único antibiótico que puede relacionarse con la resistencia reportada es el uso de sulfanilamida, utilizada en el área de partos. Llama la atención que esta resistencia se identificó en todas las áreas analizadas y en dos de los trabajadores de la granja. Las quinolonas son los antibióticos más utilizados para profilaxis y tratamiento de infecciones gastrointestinales en la granja, 18% (19/104) aislamientos de *E. coli* son resistentes a ciprofloxacina recuperados del área de pre-ceba lo que concuerda con lo reportado.

Los perfiles de resistencia identificados están asociados con los antibióticos utilizados para tratamiento y profilaxis en la granja, excepto para colistin, no utilizado en la granja según los datos proporcionados en la entrevista y cuestionario. Este antibiótico es utilizado para tratar y prevenir enfermedades infecciosas en animales ([Quesada, 2015](#), [Morales, 2012](#), [Catry 2015](#)) y para tratamiento de Infecciones por bacterias gran negativas multirresistentes a antibióticos en humanos como última opción terapéutica ([Morales, 2012](#), [Catry, 2015](#)). Estos resultados muestran la

importancia de monitorear el uso de este antibiótico en producción animal y la incompleta información del uso de antibióticos en la granja en estudio.

Todos los aislamientos de *E. coli* analizados fueron sensibles a amikacina y carbapenémicos: imipenem, ertapenem, meropenem y doripenem. Las resistencias identificadas se describen a continuación:

Tabla 10. Número y porcentaje de *E. coli* resistentes a antibióticos por área

Nº de cepas de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos por área								
Familia de antibióticos	Antibiótico	MT	GT	PT	PC	CB	TB	Total
		(n=5)	(n=30)	(n=13)	(n=23)	(n=29)	(n=4)	(n=104)
<b>β-lactámicos</b>	Amoxicilina /clavulanato	0	0	3	0	0	2	5(5)
	Ampicilina	0	5	3	19	20	3	50(58)
	Aztreonam	0	0	3	0	0	0	3(3)
	Cefalotina	1	16	11	13	21	3	65(63)
	Cefepime	0	0	0	1	0	0	1(1)
	Cefoxitina	0	0	3	3	0	1	7(7)
	Ceftazidime	0	0	3	1	0	0	4(4)
	Cefuroxima	0	0	3	1	0	0	4(4)
	Ceftriaxona	0	0	3	3	0	0	6(6)
	Piperacilina /tazobactam	0	0	0	4	0	0	4(4)
	Ampicilina /Sulbactam	0	0	0	10	2	0	12(12)
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacina	1	2	0	11	5	0	19(19)
	Levofloxacina	0	1	0	3	5	0	9(9)
<b>Polimixinas</b>	Colistin	5	24	9	20	28	0	86(83)
<b>Aminoglicosidos</b>	Gentamicina	0	0	0	5	1	0	6(6)
<b>Nitrofuranos</b>	Nitrofurantoina	0	1	1	1	3	0	6(6)
<b>Tetraciclinas</b>	Tigeciclina	0	1	0	3	3	0	7(7)
<b>Inhibidores de folato y sulfonamidas</b>	Trimetoprim	4	8	5	5	9	2	33(33)

MT: Montas, GT: Gestantes, PT: Partos, PC: Pre-ceba, CB: Ceba y TB: trabajadores

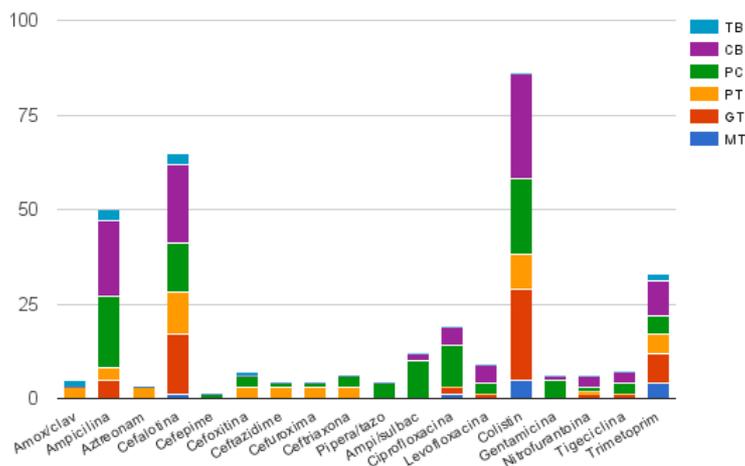


Figura 3. Número y porcentaje de *E. coli* resistentes a antibióticos por área. MT: Montas, GT: Gestantes, PT: Partos, PC: Pre-ceba, CB: Ceba y TB: trabajadores

En el área de montas el 100% *E. coli* son resistentes a colistina, el 80% resistentes a trimetropin sulfametoxazol, y el 20% a cefalotina. En gestantes se identifican altos niveles de resistencia a cefalotina 53% (16/30), colistin 80% (24/30) y trimetropin 27% (8/30) en estas áreas no reportan amplio un uso de antimicrobianos, solo en caso de infecciones.

En las áreas de partos y pre-ceba se identificaron el mayor número de antibióticos utilizados entre ellos: quinolonas,  $\beta$ -lactámicos, sulfanilamidas, macrólidos y tetraciclinas. Datos concordantes con la resistencia identificada, en partos 11/13 a cefalotina, 9/13 a colistin y 5/13, además identificamos 3 aislamientos resistentes a cefalosporinas de tercera generación, lo que indica la presencia de beta lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en el área. En pre ceba identificamos el mayor número de aislamientos resistentes a ciprofloxacina 11/23, 21/23 a colistin y 5/23 a trimetropin. En ceba solo reportan el uso de antibióticos en caso de infecciones, encontramos el perfil de resistencia predominantes en la granja, 17/29 a cefalotina, 5/29 a ciprofloxacina, 28/29 a colistin y 9/29 a trimetropin.

### **Resistencia a antibióticos en *E. faecium*, *E. faecalis* y *S. Aureus***

Los aislamientos de *E. faecium* (n=2) analizados fueron sensibles a daptomicina, estreptomina y gentamicina de alta carga, levofloxacina, linezolid, oxacilina, vancomicina, ciprofloxacina y teicoplanina. Las resistencias identificadas se describen a continuación:

Tabla 11. Número y porcentaje de resistencia a antibióticos en *E. faecium* por área y tipo de muestra

Nº de cepas de <i>E. faecium</i> resistentes a antibióticos por área				
Familia de antibióticos	Antibiótico	GT	PC	Total (n=2)
<b>β-lactámicos</b>	Ampicilina	1	0	1(50)
<b>Macrólidos</b>	Eritromicina	1	1	2(100)
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina	1	1	2(100)
	Minociclina	1	0	1(50)
<b>Nitrofuranos</b>	Nitrofurantoína	1	0	1(50)
<b>T</b>	Penicilina G	1	0	1(50)
<b>Estreptograminas</b>	Quinupristin /dalfopristin	1	1	2(100)

T: Trabajadores

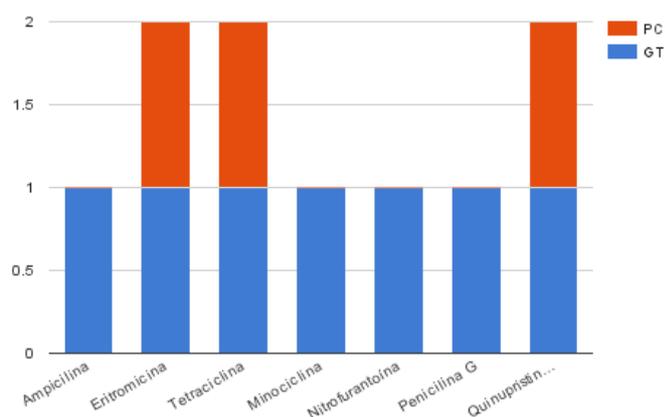


Figura 4. Número de *E. faecium* resistentes a antibióticos por área. MT: Montas, GT: Gestantes, PT: Partos, PC: Pre-ceba, CB: Ceba y TB: trabajadores

Como se observa en la tabla 11 y figura 4, en *E. faecium* se identifican altos niveles de resistencia a eritromicina, tetraciclina y quinupristin 100%, distribuida en el área de pre-ceba y gestantes donde se reporta un amplio uso de antibióticos, el 50% de los aislamientos son resistentes a Ampicilina, minociclina, Nitrofurantoína y penicilina G.

Los aislamientos de *E. faecalis* analizados (n=45) fueron sensibles a daptomicina, linezolid, nitrofurantoina, oxacilina, penicilina G, vancomicina y teicoplanina. Las resistencias identificadas se describen a continuación:

Tabla 12. Número y porcentaje de resistencia a antibióticos en *E. faecalis* por área y tipo de muestra

Número de cepas de <i>E. faecalis</i> resistentes a antibióticos por área										
Familia de antibióticos	Antibiótico	Montas	Gestantes	Partos	Pre ceba	Ceba		T	Total	
		(n=4)	(n=11)	(n=9)	(n=11)	(n=8)	(n=2)	(n=45)	%	
<b>β-lactámicos</b>	Ampicilina	0	1	0	0	0	0	0	1	2,2
<b>Macrólidos</b>	Eritromicina	1	4	9	10	8	1	33	73,3	
<b>Aminoglicósidos de alta carga</b>	Estreptomina	1	6	9	11	3	0	30	66,7	
	Gentamicina	0	0	0	9	3	0	12	26,7	
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacina	0	0	0	10	2	0	12	26,7	
	Levofloxacina	0	0	0	10	3	0	13	28,9	
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina	4	11	9	11	8	2	45	100,0	
	Minociclina	4	11	9	10	8	2	44	97,8	
<b>Nitrofuranos</b>	Nitrofurantoina	0	3	0	1	0	0	4	8,9	

T: Trabajadores

Figura 5. Número y porcentaje de *E. faecalis* resistentes a antibióticos por área. MT: Montas, GT: Gestantes, PT: Partos, PC: Pre-ceba, CB: Ceba y TB: trabajadores

Como se observa en la tabla 12 y figura 5, en *E. faecalis* se identifican altos niveles de resistencia a tetraciclinas, macrólidos y aminoglicósidos de alta carga con 100, 73,67% respectivamente, distribuidas en todas las áreas de la granja. 27% y 29% de los aislamientos son resistentes a ciprofloxacina y levofloxacina respectivamente, resistencia localizada en el área de pre-ceba donde se reportó uso de este antibiótico para profilaxis.

Todos los aislamientos de *S. aureus* analizados fueron sensibles a ampicilina, cefazolina, cefoxitin, daptomicina, eritromicina, estreptomina de alta carga, levofloxacina, linezolid, oxacilina, vancomicina y teicoplanina. Las resistencias identificadas se describen a continuación

Número de cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a antibióticos por área											
Familia de antibióticos	Antibiótico	Montas	Gestantes	Partos		Pre ceba		Ceba		T	Total
		(n=0)	(n=5)	AN	AM	AN	AM	AN	AM	(n=0)	(n=5)
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5(100)
	Minociclina	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1(20)
<b>β-lactámicos</b>	Oxacilina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Penicilina G	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1(20)
<b>Lincosamidas</b>	Clindamicina	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5(100)

Tabla 13. Número y porcentaje de resistencia a antibióticos en *S. aureus* por área y tipo de muestra

T: Trabajadores

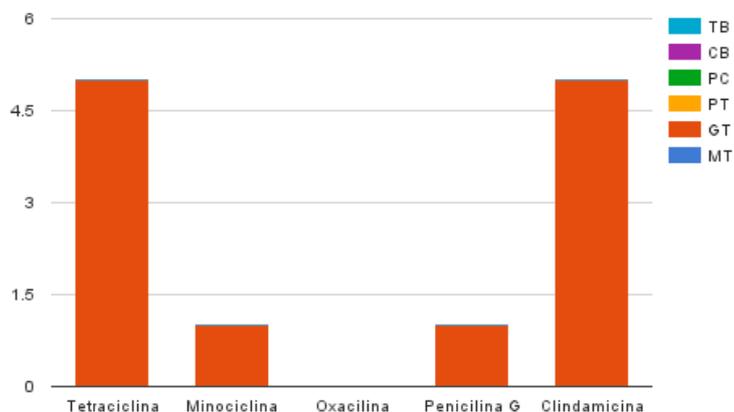


Figura 6. Número y porcentaje de *S. aureus* resistentes a antibióticos por área. MT: Montas, GT: Gestantes, PT: Partos, PC: Pre-ceba, CB: Ceba y TB: trabajadores

La recuperación de *S. aureus* fue muy baja, siendo ésta de sólo 2% de las muestras analizadas. No obstante, estas son resistentes 100% a tetraciclina, clindamicina y en menor porcentaje 20% a minociclina y penicilina G (Tabla 13 -Figura 6).

## Conclusiones

Se identificaron imprecisiones en la identificación género-especie de *Enterococcus spp* por lo cual se propone la confirmación de estos resultados con metodologías más precisas como la utilizada en este estudio.

En este estudio se aislaron bacterias antibiótico-resistentes de muestras de animales, trabajadores y ambiente de la granja de estudio. Por los datos fenotípicos de antibiograma es posible asociar la resistencia encontrada con la presión que estaría ejerciendo el uso de estos. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis se hicieron estudios moleculares y genéticos que implicaban genes específicos. En el aparte siguiente se muestra la detección de genes específicos que explican la resistencia reportada.

# Capítulo 4

## El origen de la resistencia antimicrobiana depende de genes cromosomales y extracromosomales

### Transmisión génica en bacterias

El genoma bacteriano está compuesto por un cromosoma, donde se encuentra toda la información genética necesaria para el ciclo de vida de la bacteria (información que es heredada verticalmente por la progenie celular), y elementos genéticos transferibles. Entre estos últimos se encuentran plásmidos<sup>10</sup>, secuencias de inserción, transposones e integrones<sup>11</sup>, donde se ubican genes que, bajo ciertas circunstancias favorecen supervivencia; ejemplo de estos están los que confieren resistencia a antibióticos que al expresarse generan tolerancia a estos fármacos. Además estos elementos genéticos extracromosomales, no requieren de replicación bacteriana, porque pueden ser transferidos horizontalmente de una bacteria a otra ([Ashbolt \*et al.\*, 2013](#); [Lederberg, 1998](#)).

Los plásmidos son importantes en epidemiología y evolución de resistencia a antimicrobianos, por la facilidad de diseminar genes de resistencia y virulencia. Estos se han dividido en tres clases: plásmidos pequeños de replicación círculo rodante, multirresistencia y conjugativos. Además se clasifican a partir de grupos de incompatibilidad<sup>12</sup> para la caracterización de Gram negativos, y basados en patrones de RFLP para plásmidos de gran tamaño y amplificación de regiones conservadas de genes de origen de replicación (*rep*) para bacterias Gram positivas ([Jensen \*et al.\*, 2010](#); [Lozano \*et al.\*, 2012](#)).

---

<sup>10</sup> Plásmido: segmento de DNA extracromosomal, presentes bacterias, en los cuales se pueden localizar diferentes genes de resistencia

<sup>11</sup> Transposón e integrón: elementos genéticos que se localizan tanto a nivel cromosomal y como plasmídico

<sup>12</sup> Clasificación basada en las proteínas de replicación, plásmidos con las mismas proteínas no puede mantenerse en la misma célula

Elementos genéticos portadores de determinantes de resistencia pueden ser movilizados a bacterias que residen en el mismo nicho a través de eventos de transferencia horizontal de genes mediados por procesos de conjugación, transformación y/o transducción. La selección de estos determinantes de resistencia depende de factores como penetración<sup>13</sup>, promiscuidad<sup>14</sup>, plasticidad<sup>15</sup> y persistencia<sup>16</sup> (Gonzalez-zorn, González-zorn & Escudero, 2016)

## **Origen ambiental de resistencia**

La presión que favorece la resistencia a antibióticos varía entre ecosistemas; se ha propuesto un modelo de 3 ecosistemas interconectados. El ambiente natural, donde los microorganismos encontrarían bajas concentraciones de antibióticos, la resistencia se presume baja. El medio ambiente no clínico, donde la presión ejercida por diferentes actividades humanas, aumenta el número de bacterias resistentes, y el medio ambiente clínico, donde la concentración de antibióticos es alta y por lo tanto la resistencia a antibióticos también (Davies & Davies, 2010). Este modelo ha sido ampliamente refutado por resultados obtenidos en estudios ambientales, los cuales indican contaminación por antibióticos alta y por lo tanto, prevalencia de resistencia alta, en microorganismos de ambientes donde se creían excluidos. Así, la presión antibiótica sería alta, por el uso de antimicrobianos en agricultura, sistemas de alimentación animal, industria pecuaria, desinfección de superficies y alcantarillado (Keen & Montforts, 2012; Kohanski, *et al.*, 2010; Martinez, 2009).

La exposición crónica a concentraciones de antibiótico bajas, presentes en comida para animales que se proponen promotoras de crecimiento o en sistemas de alcantarillado y en microambientes contaminados, genera respuesta de estrés en la bacteria, induciendo mutaciones y aumentando la oportunidad para la evolución de resistencia (Hong, *et al.*, 2013; Kohanski, *et al.*, 2010). Concentraciones bajas de antibióticos también favorecen la transferencia de genes de resistencia a antibióticos localizados en cromosomas bacterianos en forma de elementos conjugativos

---

<sup>13</sup> habilidad de un elemento genético de pasar de un sistema a otro y mantenerse

<sup>14</sup> habilidad de intercambio de secuencias genéticas con otros miembros del ecosistema

<sup>15</sup> variabilidad tolerada en la secuencia genética

<sup>16</sup> habilidad de permanecer, coexistir y fijarse en el sistema

integrativos (ICE). Estos elementos se escinden del cromosoma por recombinación sitio específica, y son transferidos de una bacteria a otra. De una copia de un ICE se generan 2 copias; una es heredada verticalmente y la otra es transferida horizontalmente a bacterias de otra especie o género, donde se integra a sus cromosomas amplificando así la resistencia (Toleman & Walsh, 2011).

## **Preservación de la resistencia**

La magnitud del gasto energético que impone a la bacteria, la expresión de un gen de resistencia, aparece como el principal parámetro biológico que influye en su tasa de desarrollo, estabilidad y reversibilidad (Andersson & Hughes, 2010). La expresión de genes de resistencia, genera gasto energético adicional, el cual depende del tipo de resistencia expresada; este puede disminuir la capacidad del microorganismo para sobrevivir y reproducirse (Marciano *et al.*, 2007; Petersen, *et al.*, 2009b). Algunos genes de resistencia localizados a nivel cromosomal exigen mayor gasto energético, por lo que, si la bacteria no los necesita deja de expresarlos (Enne, *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2009a), haciéndolos inducibles para un estímulo particular; el costo puede ser reducido por la regulación del mecanismo de resistencia, como en el caso de aquella a vancomicina en *S. aureus*, la cual es inducida sólo en respuesta a la presencia de glicopéptidos (Moubareck, *et al.*, 2009). Podría también cambiarlos de ubicación; existe evidencia de movilización de genes de resistencia localizados a nivel cromosomal a plataformas extracromosomales (Andersson & Hughes, 2010), disminuyendo así el gasto ocasionado porque pueden autoreplicarse independientemente sin implicar división celular. Genes de resistencia a antibióticos localizados en plataformas móviles de DNA extracromosomal, no generan costo energético a la bacteria o es marginal, razón por la cual dichos genes se mantienen y expresan por más tiempo (Enne, *et al.*, 2005).

De otro lado el fenómeno de co-selección representaría bajo costo energético y por tanto preservaría la resistencia. Este se define como la adquisición y mantenimiento de diferentes genes de resistencia localizados en la misma plataforma del gen de resistencia, característica común en la resistencia adquirida por transferencia horizontal (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2011), o la resistencia a un antibiótico al que no se ha estado expuesto por tener características estructurales similares a uno al que si se estuvo expuesto, constituyéndose en multiresistencia. Así, el tiempo requerido para reducir la expresión de resistencia a un antibiótico está inversamente relacionado con el costo biológico generado (Andersson & Hughes,

2010; Baym, *et al.*, 2015).

Sin embargo, en el escenario en el que la presión no cese, y por el contrario aumente, la situación se agravaría. Se sugiere que la industria farmacéutica ha liberado más antibióticos al ambiente que los producidos por todos los organismos que han existido ( [Martínez, 2009](#)), y la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos sintetizados se ha incrementado por uso masivo de pesticidas, fertilizantes, antisépticos y otros productos industriales ([Keen & Montforts, 2012](#)).

## **Objetivos Específicos asociados**

- Identificar las relaciones genéticas de los aislamientos obtenidos (dendogramas)

## **Diseño metodológico**

### **Obtención de DNA de las cepas aisladas**

El material genético de cada cepa recuperada fue extraído utilizando *GeneJet Genomic DNA purification kit* según las recomendaciones del fabricante y cuantificado por espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific).

### **Genotipificación bacteriana**

Para determinar si la resistencia a antibióticos está asociada con diseminación de la misma cepa o por transferencia de elementos genéticos de resistencia entre diferentes cepas circulantes, las bacterias en estudio fueron tipificadas genéticamente por género y especie con el sistema basado en fracciones repetitivas (Rep-PCR) ([Versalovic, 1997](#)). Esta metodología utiliza *primers* que reconocen elementos repetitivos palindrómicos extragenómicos y amplifican el área de DNA entre estas regiones, obteniéndose fragmentos de diferentes tamaños exclusivos de cada microorganismo. Los *primers* utilizados en este estudio fueron: Rep1R-I (5' - III ICG ICG ICA TCI GGC-3'), y Rep2-I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'). Se prepararon reacciones de 25 uL de volumen final que contenían 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 2 uM de cada primer, 0,08 U/uL de la DNA polimerasa *Máxima Hot Start Taq* y 200 ng de DNA. Las condiciones de la PCR fueron: denaturación inicial 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de: denaturación 95 °C por 1 minuto, anillamiento 43 °C por 1'30" y síntesis a 72 °C por 2'30", con extensión final de 20'.

Los patrones rep-PCR fueron resueltos utilizando la tecnología de microfluidos *Lab Chip* en el bioanalizador 2100 (Agilent), según la condiciones descritas para el sistema *Diversilab* de Biomeriux. El análisis de grupos genéticos se llevó a cabo utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (PC). Se clasificaron como cepas no relacionadas genéticamente aquellas que presentaban similitud menor de 95%, indistinguibles, muestras con porcentaje de similitud mayor a 97% y genéticamente relacionadas con porcentajes de similitud mayor a 95 y menor de 97%.

### 1.1.11 Determinación del mecanismo genético que explica la resistencia encontrada en aislamientos con susceptibilidad antibiótica disminuida

Para el análisis de susceptibilidad a antimicrobianos en este estudio se usaron valores ECOFFs<sup>17</sup>, para identificar genes y mecanismos de resistencia en ambientes no clínicos que pueden ser transmitidos a humanos, categorizando como resistentes a aquellos aislamientos con valores de CMI superiores al límite de sensibilidad reportado por EUCAST, como se mencionó previamente.

Se identificaron altos niveles de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, colistin (polimixina E), trimetropin sulfametoxazol y quinolonas. Se evaluaron los principales genes de resistencia asociados a las resistencias encontradas.

## Resistencia a $\beta$ -lactámicos

Tabla 14. Iniciadores utilizados para la múltiplex 1: *TEM-SHV* y *OXA.-1*

Multiplex I: <i>TEM, SHV</i> y <i>OXA-1-like</i>						
Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Genes	Primers [uM]	Tm	Tamaño [pb]	
MultiTSO-T_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>TEM1-2</i>	0,4	60	800	
MultiTSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		0,4			
MultiTSO-S_for	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	<i>SHV-1</i>	0,4	60	713	
MultiTSO-S_rev	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		0,4			
MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	<i>OXA-1-4</i>	0,4	57	564	
MultiTSO-O_rev	GACCCAAGTTTCCTGTAAGTG	<i>OXA-30</i>	0,4			

<sup>17</sup> puntos de corte epidemiológico propuestos por EUCAST

Tabla 15. Iniciadores utilizados para múltiplex II: CTX-M grupo 1, 2, 8, 9 y 25

Múltiplex II: CTX-M grupo 1,2,8,9 y 25					
Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Genes	Primers [uM]	Tm	Tamaño [pb]
MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA*	CTX-M-1-3-15	0,4	60	688
MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT*		0,2		
MultiCTXMGp2_for	CGTTAACGGCACGATGAC	CTX-M-2	0,2	60	404
MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT*		0,2		
MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	CTX-M-9-14	0,4	60	561
MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG		0,4		
CTX-Mg8/25_for	AACRCRCAGACGCTCTAC*	CTX-M-8, 25,26,39,41	0,4	60	326
CTX-Mg8/25_rev	TCGAGCCGGAASGTGYAT*		0,4		

En los aislamientos resistentes a  $\beta$ -lactámicos se evaluó la presencia de genes que codifican para las proteínas TEM1-2, SHV-1, OXA 1-4-30, y los grupos CTX-M1, 2, 8 y 25. Además se evaluaron los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC plasmídicas ACC1-2, FOX 1-5, MOX 1-2, CMY 1-8-11-19-2-7-12-18 y 21, DHA1-2, LAT-1-3, BIL-1, ACT y MIR-1, mediante PCRs múltiples, según el protocolo descrito por [Dallenne, et al., 2010](#). La lista de *primers*, temperatura de anillamiento utilizados y el tamaño del producto de amplificación se describen en las [tablas 14, 15 y 16](#).

Tabla 16. Iniciadores utilizados para múltiplex III: ACC, FOX, MOX, DHA, CIT Y EBC

Múltiplex III: ACC, FOX, MOX, DHA, CIT y EBC					
Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Genes	Primers [uM]	Tm	Tamaño [pb]
MultiCaseACC_for	CACCTCCAGCGACTTGTTAC	ACC 1-2	0,2	60	346
MultiCaseACC_rev	GTTAGCCAGCATCACGATCC		0,2		
MultiCaseFOX_for	CTACAGTGCGGGTGGTTT	FOX 1-5	0,5	60	162
MultiCaseFOX_rev	CTATTTGCGCCAGGTGA		0,5		
MultiCaseMOX_for	GCAACAACGACAATCCATCCT	MOX-1-2, CMY- 1-8-11-19	0,2	60	895
MultiCaseMOX_rev	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA		0,2		
MultiCaseDHA_for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	DHA 1-2	0,5	60	997
MultiCaseDHA_rev	GCTTTGACTCTTTCGGTATTCCG		0,5		
MultiCaseCIT_for	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	LAT-1-2-3, BIL- 1, CMY-2-7-12- 18-21-22-23	0,2	60	538
MultiCaseCIT_rev	ACGGACAGGGTTAGGATAGY*		0,2		
MultiCaseEBC_for	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	ACT-1 y MIR-1	0,2	60	683
MultiCaseEBC_rev	AGCCTAACCCCTGATACA		0,2		

## Resistencia a Colistin

Se evaluó la presencia del gene *MCR-1* codificado a nivel plasmídico en las cepas resistentes a colistin. Para esto se prepararon reacciones similares a las descritas. Las condiciones de la PCR fueron denaturación inicial 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 3", anillamiento 45 °C por 30" y síntesis 72 °C por 30 segundos, con extensión final de 5'.

Los productos de amplificación por PCR fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,5% en buffer TBE 0,5X, utilizando como marcador de peso molecular *GeneRuler 100 pb DNA ladder* (Thermo Scientific). Las muestras fueron reveladas con bromuro de etidio (0,5 ug/mL). La lista de *primers*, temperatura de anillamiento utilizados y tamaño esperado del producto de amplificación se describen a en la [tabla 17](#).

Tabla 17. Iniciadores para el gen *MCR-1*

Iniciadores para resistencia colistin codificado a nivel plasmídico						
Iniciadores	Secuencia (5' - 3')	Gen	Tm	Primers [uM]	Tamaño [pb]	Referencia
MCR-1 F	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	<i>MCR-1</i>	46	0,4	309	Liu <i>et al.</i> , 2016
MCR-1 R	CTTGGTCGGTCTGTA GGG		46	0,4		

## Resistencia a quinolonas

Para la caracterización de la resistencia a quinolonas a nivel cromosomal se amplificaron los genes *gyrA* y *ParC*, bajo condiciones similares a las descritas con ajuste de temperatura de anillamiento 52 °C por 1 minuto.

Para la evaluación de los genes que confieren resistencia a quinolonas codificados a nivel plasmídico (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *qepA*, *oqxA*, *oqxB* y *aac(6')-Ib*), se hicieron reacciones de PCR bajo condiciones similares a las descritas con ajuste de temperatura de anillamiento 57 °C (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y *AAC(6')-Ib-Cr*), 60°C (*qepA*) o 62 °C (*oqxA* y *oqxB*) por 1 minuto. La lista de *primers* y temperatura de anillamiento utilizados junto con el tamaño del producto de amplificación esperado se describen en la [tabla 18](#).

Tabla 18. Iniciadores para la amplificación de genes que confieren resistencia a quinolonas

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Gen	Tm	Tamaño [pb]	Referencia
<i>qnrA-F</i>	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	57	619	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>qnrA-R</i>	GCAGCACTATKACTCCCAAGG				
<i>qnrB-F</i>	GGMATHGAAATTCGCCACTG	<i>qnrB</i>	57	264	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
<i>qnrB-R</i>	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA				
<i>qnrC-F</i>	GGGTTGTACATTTATTGAATC	<i>qnrC</i>	57	447	Wang <i>et al.</i> , 2009
<i>qnrC-R</i>	TCCACTTTACGAGGTTCT				
<i>qnrD-F</i>	CGAGATCAATTTACGGGAATA	<i>qnrD</i>	57	582	Cavaco <i>et al.</i> , 2009
<i>qnrD-R</i>	AACAAGCTGAAGCGCCTG				
<i>qnrS-F</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGCT	<i>qnrS</i>	57	428	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
<i>qnrS-R</i>	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG				
<i>qepA-F</i>	CTGCAGGTACTGCGTCATG	<i>qepA</i>	60	403	Cattior <i>et al.</i> , 2008
<i>qepA-R</i>	CGTGTGCTGGAGTTCTTC				
<i>oqxA-F</i>	GACAGCGTCGCACAGAATG	<i>oqxA</i>	62	339	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>oqxA-R</i>	GGAGACGAGGTTGGTATGGA				
<i>oqxB-F</i>	CGAAGAAAGACCTCCCTACCC	<i>oqxB</i>	62	240	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>oqxB-R</i>	CGCCGCCAATGAGATACA				
<i>aac-F</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	<i>aac(6)-Ib</i>	57	482	Park <i>et al.</i> , 2006
<i>aac-R</i>	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT				
<i>gyr A-F</i>	CGCTTTGCGATGTGCAG	<i>Gyr A</i>	52	626	Corpoica*
<i>gyr A-R</i>	CGACCTTGCGAGAGAAAT				
<i>Par c-F</i>	CTACTCCTTGTACGTSATCATGGA	<i>Par C</i>	52	288	Corpoica*
<i>Par c-R</i>	GCGAACGATTTCCGGATCGTC				

\*Secuencia de *primers* proporcionadas por el grupo de resistencia antimicrobiana de CORPOICA.

## Resistencia a sulfonamidas

Para documentar esta se evaluó la presencia de integrones clase 1, 2 y 3, y los genes *sul 1* y *sul 2* que confieren resistencia a sulfonamidas, más el gen *qacEΔ1* asociado con resistencia a amonio cuaternario en todas las cepas de *E. coli* analizadas. Para la detección se prepararon reacciones de PCR como las descritas previamente modificando sólo temperatura de anillamiento así: 50 °C para *Integrasa1-3* y *Sul2*, 60 °C para *Sul1* y *qacEΔ1* por 1 minuto y síntesis 72 °C por 1 minuto, con extensión final 5'. Los productos de amplificación por PCR fueron evaluados como se describió. *Primers*, temperatura de anillamiento y tamaño esperado del producto de amplificación se describen en la [tabla 19](#).

Tabla 19. Iniciadores utilizados para la detección de los genes *Int1*, *2*, *3*, *Sul1-2*, *qacE1*

Primer	Secuencia (5'-3')	Genes	Tm	Tamaño	Referencia
<b>Int123_for</b>	TGCGGGTYAARGATBTKGATTT	<i>Int 1,2 y 3</i>	49	491	<a href="#">White et al., 2000</a>
<b>Int123_rev</b>	CARCACATGCGTRTARAT				
<b>Sul1_for</b>	TGGTGACGGTGTTCGGCATTTC	<i>sul1</i>	60	789	<a href="#">Sáenz et al., 2004</a>
<b>Sul1_rev</b>	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG				
<b>Sul2_for</b>	CGGCATCGTCAACATAACC	<i>sul2</i>	50	722	
<b>Sul2_rev</b>	GTGTGCGGATGAAGTCAG				
<b>qacΔ_for</b>	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	<i>qacΔ</i>	60	274	
<b>qacΔ_rev</b>	TGAGCCCCATACCTACAAAGC				

## Obtención y purificación de DNA plasmídico

Los genes identificados se han reportado en plataformas genéticas móviles como plásmidos. Para determinar el grupo de incompatibilidad circulante se recuperó DNA plasmídico de los aislamientos de *E. coli* resistentes identificados. Se utilizó el *kit* de extracción *GeneJET Plasmid Miniprep*, utilizando ácido nalidíxico para la selección de bacterias portadoras de plásmidos con el gen *qnrB* identificado por PCR y penicilina para los portadores de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos.

## Identificación de grupos de incompatibilidad de plásmidos

Con el fin de identificar los grupos de incompatibilidad de los plásmidos, se siguió la metodología descrita por [Carattoli et al., 2005](#) que consiste en 5 PCRs múltiplex para la evaluación de 15 grupos de incompatibilidad: HI1, HI2, I1, X, N, L/M, FIA, FIB, W, IncP, IncY, FIC, A/C, T y FIIAs. Los *primers* y concentraciones utilizadas en este estudio se describen en la [tabla 20](#). Las reacciones de PCR ya han sido descritas y fueron ajustadas para temperatura de anillamiento de 52 °C por 30 segundos. Las condiciones de las 3 monoplex F, K y B/O fueron similares a las descritas cambiando solamente temperatura de anillamiento de 60 °C por 30 segundos. Los productos de amplificación por PCR se separaron por electroforesis en condiciones similares a las ya presentadas

Tabla 20. Iniciadores para la identificación de 18 grupos de incompatibilidad de plásmidos.

Nombre	Secuencia DNA (5'-3')	Gen	Tamaño [pb]	Referencia
HI1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	<i>parA-parB.</i>	471	Carattoli et al., 2005
HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	<i>iterons</i>	644	
HI2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	<i>RNAI</i>	139	
I1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	<i>ori y</i>	376	
X RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC			
L/M FW	GGATGAAACTATCAGCATCTGAAG	<i>repA,B,C</i>	785	
L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	<i>repA</i>	559	
N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	<i>iterons</i>	462	
FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
FIB FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	<i>repA</i>	702	
FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
W FW	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	<i>repA</i>	242	
W RV	GGTGCGCGGCATAGAACCGT			
Y FW	AATTCAAAACAACACTGTGCAGCCTG	<i>repA</i>	765	
Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAACTTT			
P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	<i>iterons</i>	534	
P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	<i>repA2</i>	262	
FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	<i>repA</i>	465	
A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	<i>repA</i>	750	
T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
FIIS FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC	<i>repA</i>	270	
FIIS RV	CTCTGCCACAACTTCAGC			
FrepBFW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	<i>RNAI/repA</i>	270	
FrepB RV	GAAGATCAGTCACACCATCC			
K/B FW	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	<i>RNAI</i>	160	
K RV	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
B/O RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	<i>RNAI</i>	159	

### Resistencia a Oxazolidina y fenicoles en *E. faecium* y *E. faecalis*

Se evaluó la presencia del gene *optrA* codificado a nivel plasmídico en las cepas *Enterococcus faecalis* y *faecium* analizados, a pesar de no identificar resistencia

a estos grupos de antibióticos por el análisis de susceptibilidad, por secuenciación identificamos el gen en uno de los aislamientos evaluados. Las condiciones de la PCR fueron denaturación inicial 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 45", anillamiento 55 °C por 45" y síntesis 72 °C por 2 minutos, con extensión final de 5'.

Los productos de amplificación por PCR fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,5% en buffer TBE 0,5X, utilizando como marcador de peso molecular *GeneRuler 100 pb DNA ladder* (Thermo Scientific). Las muestras fueron reveladas con bromuro de etidio (0,5 ug/mL). La lista de *primers*, temperatura de anillamiento utilizados y tamaño esperado del producto de amplificación se describen a en la [tabla 21](#).

**Tabla 21.** Iniciadores para el gen *OptrA*

Iniciadores para evaluar resistencia a oxazolidina y fenicoles codificado a nivel plasmídico						
Iniciadores	Secuencia (5' - 3')	Gen	Tm	Primers [uM]	Tamaño [pb]	Referencia
OptrA- F	AGGTGGTCAGCGAACTAA	<i>OptrA</i>	55	0,2	1395	(Y. Y. Liu et al., 2016)(Y. Y. Liu et al., 2016)(Y. Y. Liu et al., 2016)
OptrA- R	ATCAACTGTTCCCATTCA		55	0,2		

### **Análisis estadístico para evaluar la relación entre el uso de antimicrobianos en la granja y la resistencia a antibióticos en los aislamientos de *E. coli*.**

Los datos de uso de antibióticos, resistencia antimicrobiana y genes de resistencia identificados fueron manipulados con el software libre RStudio. La asociación entre el uso de antimicrobianos en los aislamientos de *E. coli* resistente a múltiples antimicrobianos se analizó utilizando los modelos de regresión logística y Poisson siguiendo las recomendaciones de (Varga, Rajić, et al., 2009).

El análisis se realizó entre los aislamientos resistentes y la suma de respuestas asociadas a la resistencia para el total de los antibióticos analizados, generando una nueva variable etiquetada como respuesta, que incluyó entre dos y trece antimicrobianos. La nueva variable tenía distribución de Poisson lo que facilita el

uso de modelos basados en esta distribución. Las variables fueron construidas desde los datos de uso de antimicrobianos para tratamiento y profilaxis reportados, todas de naturaleza dicotómica, además fueron incluidas aquellas con información suficiente para el análisis, eliminando variables con baja o ninguna variabilidad o muy pocos datos. Se agruparon las áreas según la frecuencia de uso de antibióticos en dos categorías: machos, gestantes y trabajadores en una y partos, pre-ceba y ceba en la otra. Los modelos ajustados involucraron solo efectos principales, pues no fue posible estimar la interacción. En algunos casos se usó la eliminación hacia atrás para dejar solo aquellos efectos principales que explican la variabilidad en la respuesta.

Las variables analizadas fueron:

1. Resistencia a dos o más antimicrobianos (variable respuesta), Uso de antimicrobianos en las áreas de partos, pre-ceba y ceba, Uso de quinolonas para profilaxis, Uso de ceftiofur para profilaxis, Uso de amoxicilina para tratamiento, Uso de macrólidos para tratamiento , Uso de tetraciclinas para tratamiento
2. Detección de genes de resistencia (variable respuesta), presencia de los genes *qnrB*- uso de quinolonas para profilaxis y mutaciones en los genes *gyrA-Parc*; detección de genes *blaTEM*, uso de ceftiofur para profilaxis y uso de amoxicilina para tratamiento. Por último resistencia a antimicrobianos, dxpresencia de los genes *Int1-3*, *Sul1*, *Sul2*, *qacD* y uso de sulfamidas para profilaxis.

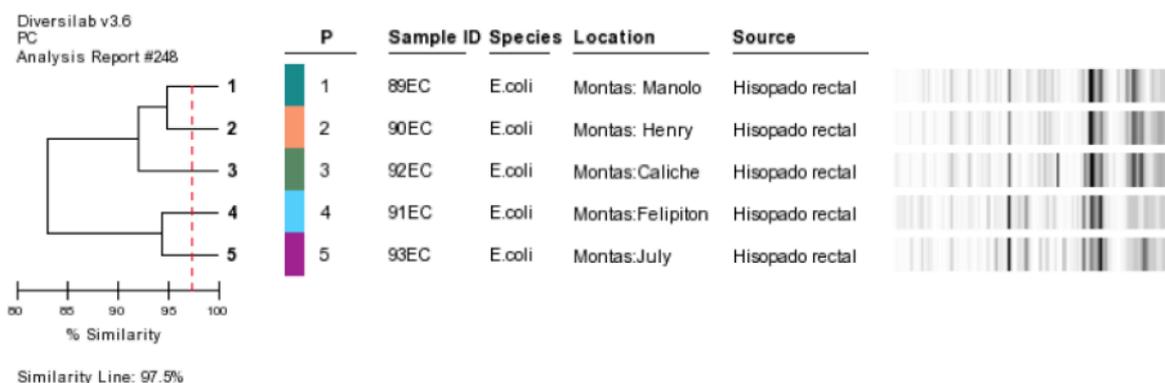
## **Resultados**

### **1.1.12 Identificación de relaciones genéticas de los aislamientos obtenidos (dendrogramas)**

#### **Tipificación de *E. coli* por áreas**

Se analizaron las cepas de *E. coli* recuperadas (n=104) por área para determinar si estaban relacionadas genéticamente entre ellas o si pertenecían a grupos diferentes que movilizan determinantes genéticos de resistencia. El análisis por Diversilab arroja patrones o grupos genéticos, basados en un porcentaje mínimo de similitud de 96%.

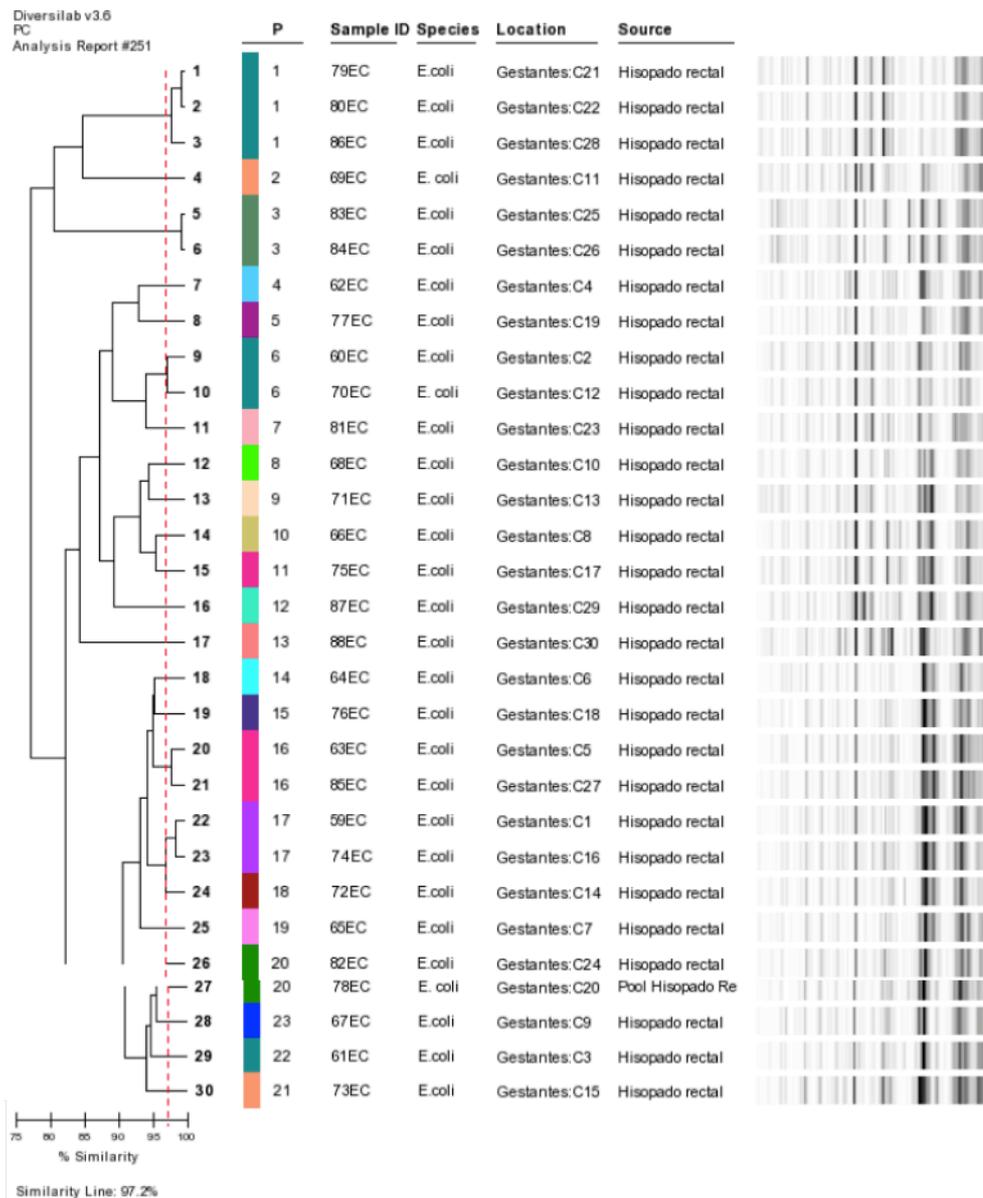
### Montas



**Figura 7.** Relaciones genéticas de cepas de *E. coli* del área de montas. Cada patrón genético discriminado se representa con un color y número consecutivo diferente en la gráfica. Así mismo a partir de la barra de corte, en rojo y punteada, se encuentra una ramificación individual para cada uno. El código de bandas, en gris, es diferente para cada grupo.

En el área de montas, se obtienen 5 grupos genéticos de las 5 cepas analizadas. No se identifica relación genética entre las cepas de *E. coli* para esta área (Figura 7), en otras palabras cada aislamiento es una cepa diferente que corresponde bien con el hecho que los machos están separados en corrales individuales y sólo tienen contacto temporal con algunas hembras.

## Gestantes



**Figura 8.** Relaciones genéticas de *E. coli* del área de gestantes. Al observar la barra de colores se señalan los diferentes patrones obtenidos. El grupo 1 se deriva de 3 aislamientos cuya ramificación principal queda sobre la barra de corte. El código de bandas es idéntico para estos 3 aislamientos de este grupo y diferente de los otros grupos.

Para el área de gestantes donde sólo hay hembras con máximo 64 días de embarazo, el análisis muestra 21 grupos genéticos en 30 cepas estudiadas (**Figura 8**). De éstos 16 son grupos individuales, es decir diferentes. No obstante, se identificaron 4 grupos genéticos conformados por dos aislamientos cada uno, y 1 por 3. A pesar de identificarse como grupo genéticos relacionados, no presentan características de resistencia similares, si bien los animales están ubicados en corrales individuales y

aislados de contacto con el resto. Esto podría explicarse por presión antibiótica en el área, que selecciona algunas cepas y elementos genéticos de resistencia.

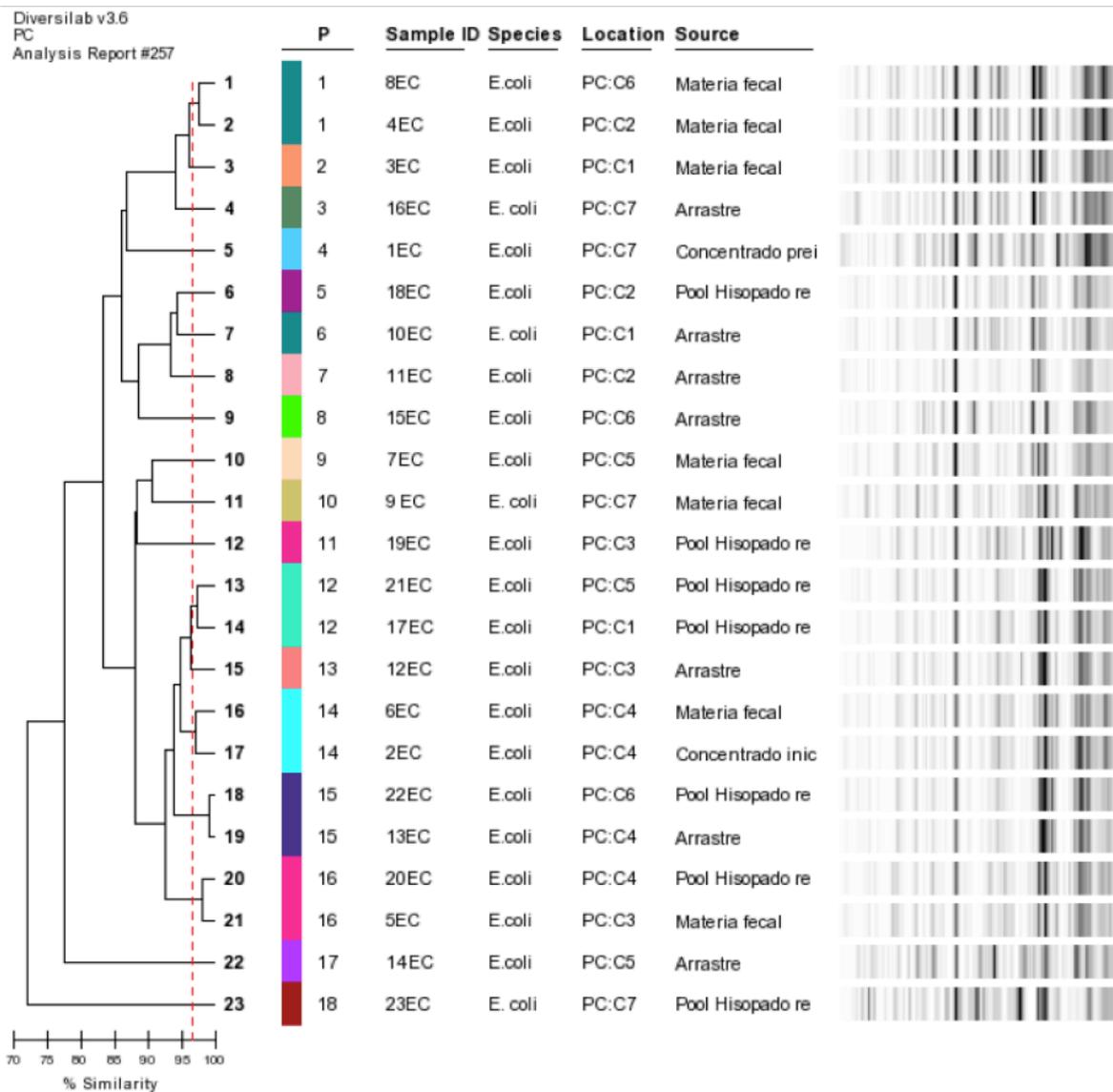
## Partos



**Figura 9.** Relaciones genéticas de *E. coli* del área de partos. 11 patrones fueron encontrados (observe la barra de colores con el número correspondiente). Sólo 2 grupos 6 y 10 se derivan de más de un aislamiento.

En esta área se encuentran cerdas gestantes y recién nacidos en corrales familiares. Las muestras aquí son algunas individuales (madres; n=6) y una del alimento administrado, y otras en *pool* (recién nacidos; n=6). De 13 cepas analizadas, se encontraron 11 grupos genéticos sugiriendo diversidad relativa alta (Figura 9). Sin embargo, se identifican 2 grupos genéticos conformados por dos aislamientos cada uno, que corresponden al grupo 6 recuperado de un grupo de lechones y una cerda provenientes de diferentes corrales, con el mismo perfil de susceptibilidad. Si bien hay intercambio de lechones de bajo peso de un corral a otro según la capacidad productora de leche de la madre, esta movilización puede explicar la diseminación de estos grupos clonales. Por ejemplo, el grupo 10 conformado por dos cepas de lechones del mismo módulo y diferente corral, presentan el mismo perfil de resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

## Pre-ceba



**Figura 10.** Relaciones genéticas de *E. coli* del área de pre-ceba. Nótese los 18 patrones encontrados (barra de colores). Los aislamientos que corresponde a un mismo patrón tienen un código de bandas (en tonos de gris) idéntico.

El análisis por Diversilab arrojó 18 grupos genéticos de las 23 cepas analizadas (Figura 10). Las muestras aquí son algunas individuales (residuos de corral; n=14) y una del alimento administrado, y otras en *pool* por corral (cerdos por corral(n=10); total de corrales analizados n=7). Se identifican 5 grupos genéticos conformados por dos aislamientos cada uno. Los grupos 1 y 15 con dos cepas recuperadas de corrales diferentes, presentan el mismo perfil de susceptibilidad, lo que sugiere la diseminación de cepas de un mismo grupo o linaje y poseen un ancestro en común. El grupo 12 conformado por dos cepas recuperadas de *pool* de HR de dos corrales analizados, presentan perfiles de resistencia diferentes (Figura 10). Además mientras la cepa del

corral 5 es resistente a ciprofloxacina, donde hay alta presión antibiótica a este medicamento, la del corral 1 es sensible. En esta área están los animales que van a pasar al área de cepa y la presión antibiótica disminuye porque hay menor exposición, sugiriendo diferencias a nivel cromosomal por mutaciones de los genes *gyrA* y *parC*, poniendo en duda el poder discriminatorio de esta metodología.

El grupo 14 conformado por una muestra de residuos de corral y otra aislada del alimento, (Figura 10), en el análisis de resistencia detectamos diferentes genes de resistencia y grupos de incompatibilidad entre ellos, lo que sugiere la movilización de genes por elementos extracromosomales, como plásmidos, secuencias de inserción y/o transposones, no analizados por esta metodología.

### **Ceba**

El análisis por Diversilab indica 23 grupos genéticos de 29 cepas analizadas (Figura 11). Las muestras aquí son algunas individuales (residuos de corral; n=17) y dos del alimento administrado, y otras en *pool* por corral (cerdos por corral(n=10); total de corrales analizados n=10). Se identifica un grupo genético (#6) conformado por 4 aislamientos recuperados de muestras ambientales de diferentes corrales, resistentes a  $\beta$ -lactámicos y colistin, lo que sugiere la selección de un grupo clonal por presión antibiótica. Además se observan otros 3 grupos genéticos conformados por dos aislamientos cada uno, de diferentes muestras y corrales, con diferentes perfiles de susceptibilidad, sugestivo de presencia de diferentes elementos genéticos de resistencia en las cepas en estudio.

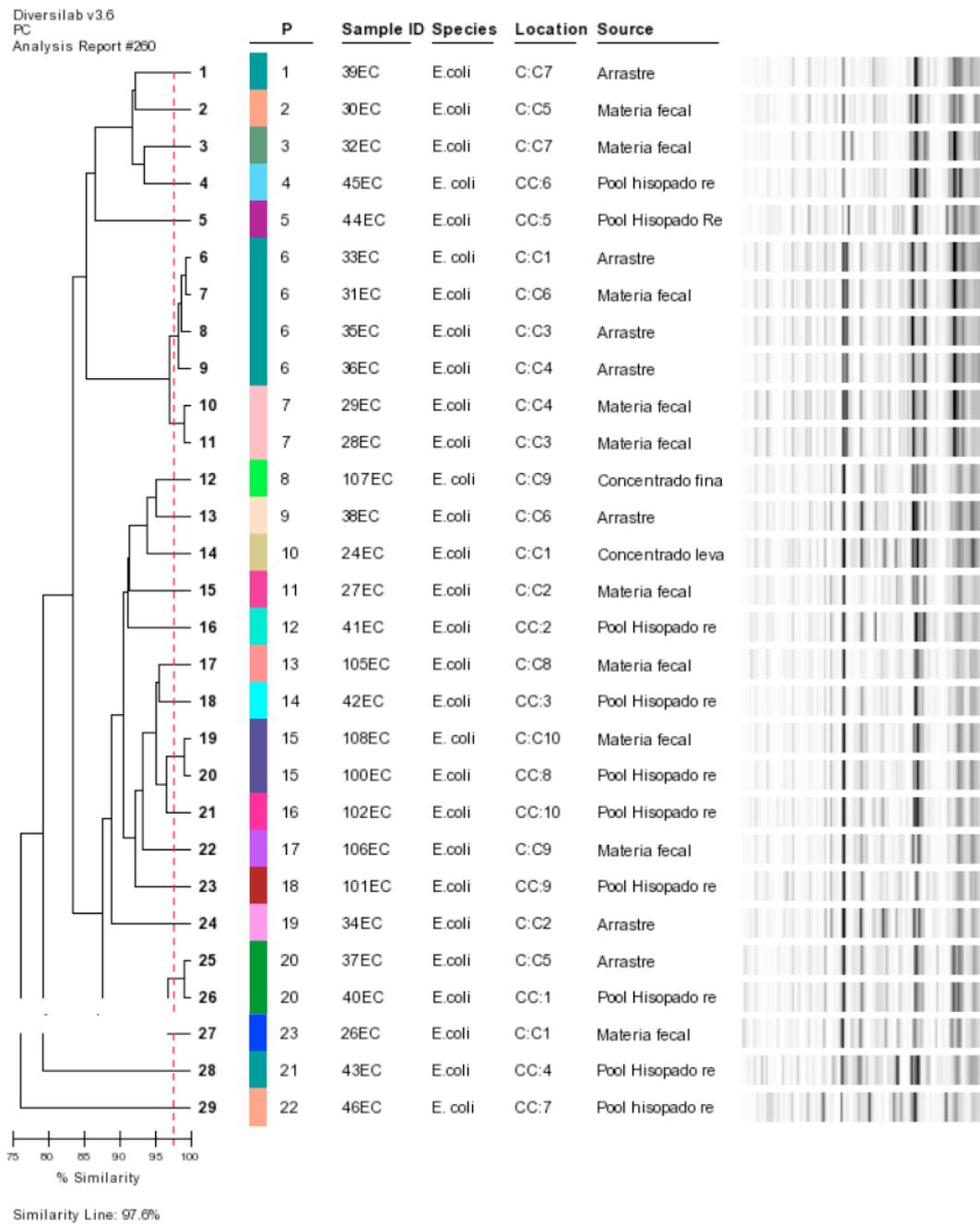


Figura 11. Relaciones genéticas de *E. coli* del área de ceba. Se observan en la barra de colores los 22 patrones encontrados. El grupo 6 es resultado de 4 aislamientos. El código de bandas asociado es igual para este grupo.

## Tipificación de *E. faecium*

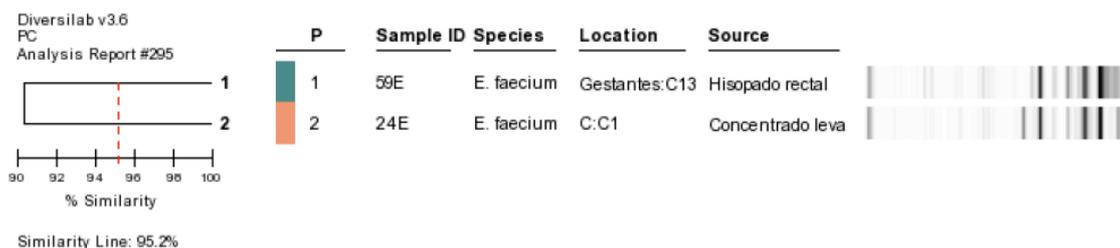
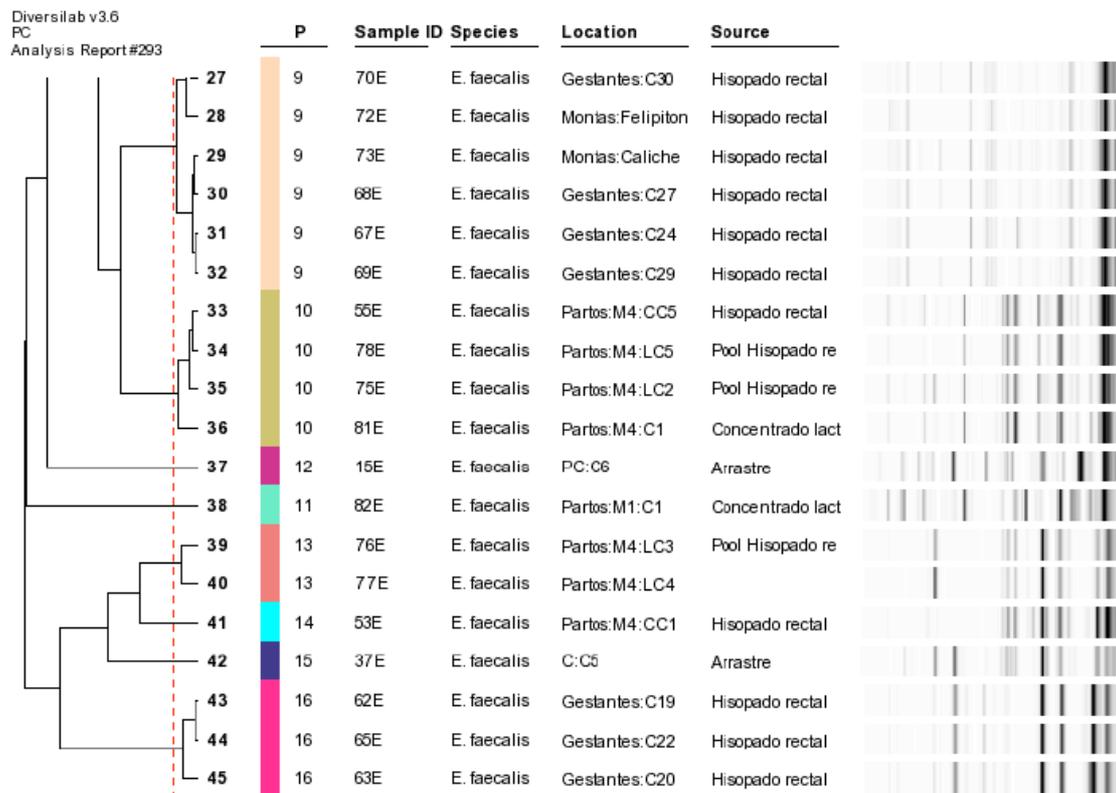


Figura 12. Relaciones genéticas de *E. faecium* recuperadas en la granja. Observe 2 grupos genéticos a partir de las muestras analizadas.

Se analizaron el total de las cepas de *E. faecium* recuperadas (n=2). Los análisis de clonalidad muestran 2 patrones (Figura 12), los cuales 3 no están relacionados genéticamente.

## Tipificación de *E. faecalis*



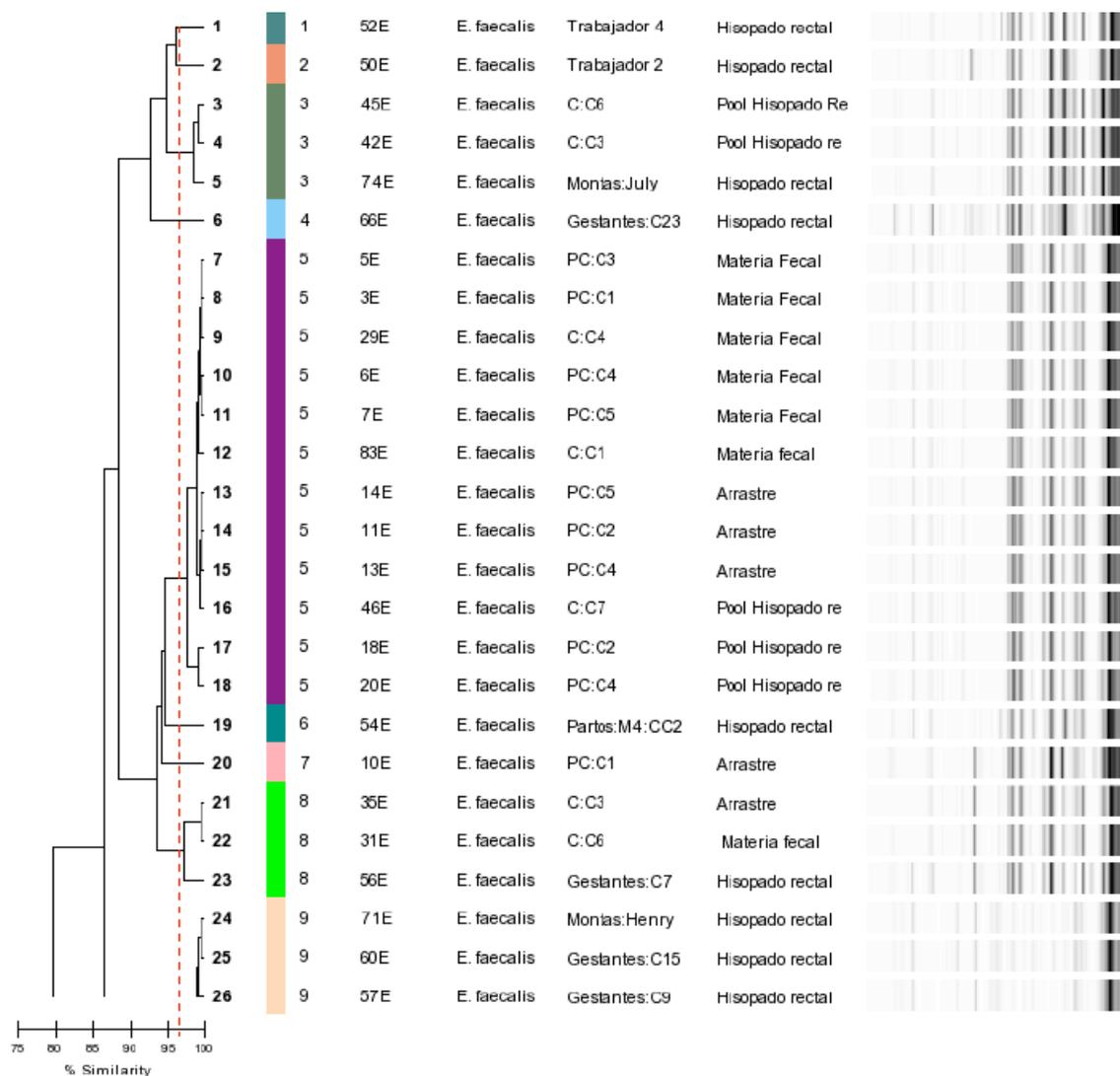
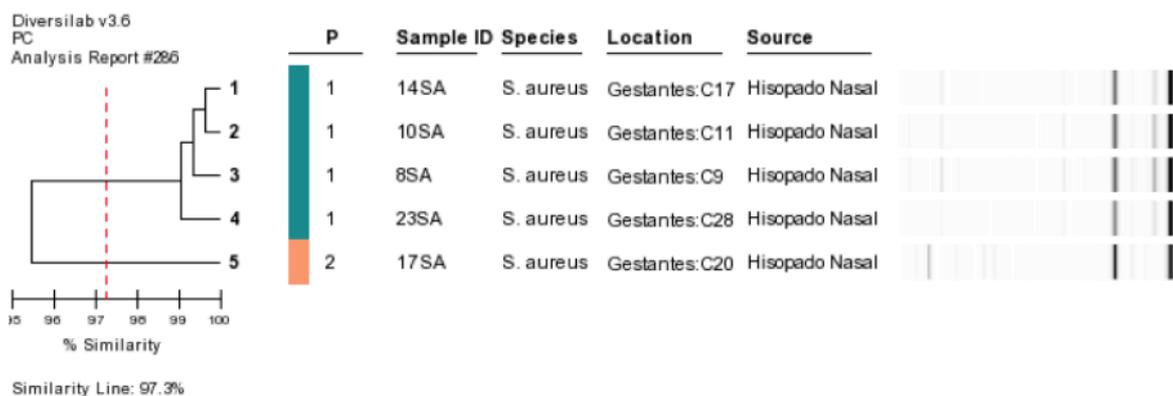


Figura 13. Relaciones genéticas de *E. faecalis*. Note en las barras de colores la discriminación de 16 patrones diferentes en donde el 5, en azul claro, se destaca porque representa 12 aislamientos.

Se analizaron el total de las cepas de *E. faecalis* recuperadas (n=45). El análisis muestra 16 patrones (Figura 13), de los cuales 6 están conformados por más de 2 aislamientos. Por ejemplo, el grupo 5 está conformado por 12 aislamientos de las áreas de pre-ceba y ceba, 9 de los cuales se recuperaron de muestras ambientales y 3 de *pools* de HR de áreas y corrales diferentes. El grupo 8 conformado por 3 muestras de las áreas de gestantes y ceba y el grupo 9 con 9 muestras de las áreas de montas y gestantes, presentan el mismo perfil de susceptibilidad, sugiriendo diseminación de una misma cepa entre las áreas analizadas.

## Tipificación de *S. aureus*



**Figura 14.** Relaciones genéticas de *S. aureus*. Note en las barras de color la presencia de 2 patrones uno de los cuales (1) representa 4 aislamientos.

Se analizaron el total de las cepas de *S. aureus* recuperadas (n=5) del área de gestantes. En este análisis se encontraron 2 patrones (Figura 14), de los cuales 1 está conformado por 4 aislamientos, con el mismo perfil de susceptibilidad, sugiriendo diseminación de la misma cepa entre animales del área, y el grupo 2 conformado por 1 aislamiento que estaría relacionado con el grupo 1 identificado, y presenta perfiles de resistencia diferentes al grupo clonal indicativo de la adquisición de otros genes de resistencia quizás por la presión antibiótica a la que están expuestos.

### 1.1.13 Genes de resistencia identificados

En *E. coli* se identificaron niveles de resistencia altos a ampicilina 48% (50/104), cefalotina 63% (65/104), colistin 83% (86/104), trimetropin 40% (42/104) y en menor proporción a ciprofloxacina 18% (19/104) y ampicilina sulbactam 18% (19/104). Para determinar que genes explican los perfiles de resistencia encontrados, se evaluó la presencia de genes específicos que confieren resistencia a  $\beta$ -lactámicos, colistin y quinolonas.

## Resistencia a $\beta$ -lactámicos

El 69% de las cepas de *E. coli* analizadas son resistentes a cefalotina, cefalosporina de primera generación, mientras 41% a ampicilina, ambos antibióticos  $\beta$ -lactámicos que pueden ser inactivados por enzimas denominadas  $\beta$ -lactamasas descritas en Enterobacterias. En este estudio se evaluó la presencia de  $\beta$ -lactamasas tipo TEM, SHV y OXA en estos aislamientos. El gen *bla* TEM de los grupos 1-2 se identificó en 53% de las cepas resistentes a cefalotina, explicando así el fenotipo detectado. Los genes *bla* SHV y *bla* OXA, no se identificaron en *E. coli* de muestras de animales, ni ambientales pero sí de trabajadores, donde 2 de las 4 analizadas son positivas (tabla 22).

Tabla 22. Genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos identificados por área y tipo de muestra

Enzimas identificadas por área y tipo de muestra										
Enzimas	Montas (n=5)	Gestantes (n=30)	Partos (n=13)		Pre-ceba (n=23)		Ceba (n=29)		T (n=4)	Total n (%)
	AN	AN	AN	AM	AN	AM	AN	AM	HR	
TEM (n=73)	0	2	0	1	6	14	5	11	0	39(53)
OXA (n=73)	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2(3)
SHV (n=73)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0)
CTX (n=22)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1(4)
AmpC (n=22)	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3(14)

T: trabajadores

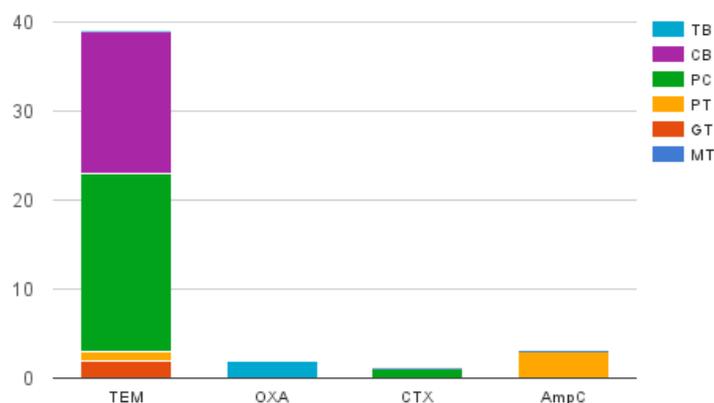
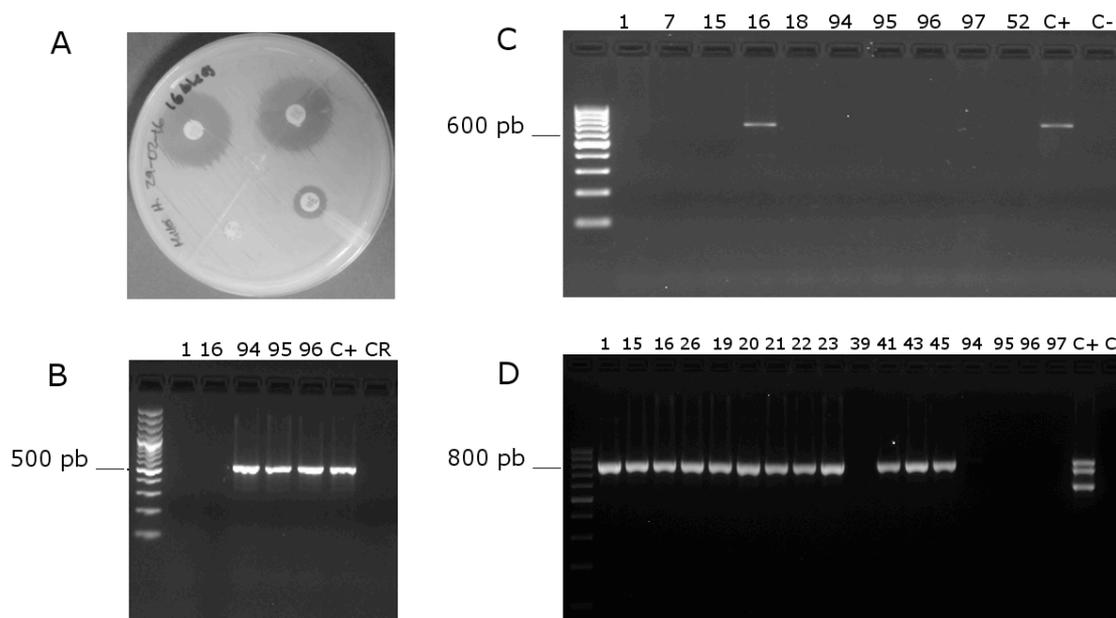


Figura 15. Genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos identificados por área. MT: Montas, GT: Gestantes, PT: Partos, PC: Pre-ceba, CB: Ceba y TB: trabajadores

En aislamientos resistentes a ampicilina sulbactam y cefalosporinas de tercera y cuarta generación (n=22), se evaluó la presencia de los genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) tipo *CTX-M* o *AmpC* codificadas a nivel plasmídico. Se identificaron 4 BLEEs, una del tipo *CTX-M* del grupo 1 en una de las muestras ambientales recuperada del área de pre-ceba y 3 tipo *AmpC* plasmídicas obtenidas de *pool* de hisopado rectal de 3 corrales del área de partos (Figura 16).



**Figure 16.** Resistencia a  $\beta$ -lactámicos en las cepas en estudio. A. Prueba de difusión de agar, cepa de *E. coli* sugestiva de presencia de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEEs). Note resistencia a ceftazidima (10 mm) y cefotaxime (6 mm), aumento del halo más de 5 mm con el inhibidor ceftazidima + ácido clavulanaro (24 mm) y cefotazime + ácido clavulanato (24 mm). B. Productos de PCR para la amplificación de un fragmento del gen *ampC*, una  $\beta$ -lactamasa, peso esperado 538 pb, separados por electroforesis en gel de agarosa. C. Productos de amplificación del gen *CTXM-1*, una  $\beta$ -lactamasa, peso esperado 688 pb. D. Productos de amplificación del gen *TEM*, una  $\beta$ -lactamasa, peso esperado 800 pb.

## Resistencia a Colistin

83% (86/104) de las cepas de *E. coli* analizadas son resistentes a colistin (Tabla 23). Este dato es preocupante porque este antibiótico se considera como última opción en algunos tratamientos médicos.

Tabla 23. Aislamientos portadores del gen *mcr-1* positivos para colistin identificadas por área

Aislamientos portadores del gen <i>mcr-1</i> positivos para colistin identificadas por área							
Enzimas	Montas (n=5)	Gestantes (n=30)	Partos (n=13)	Pre-ceba (n=23)	Ceba (n=29)	T (n=4)	Total (n=104)
<i>MCR-1</i> (n=84)	5	23	8	20	28	0	84 (81%)

AN: animales, AM: ambiente, HR: hisopado rectal, T: Trabajadores

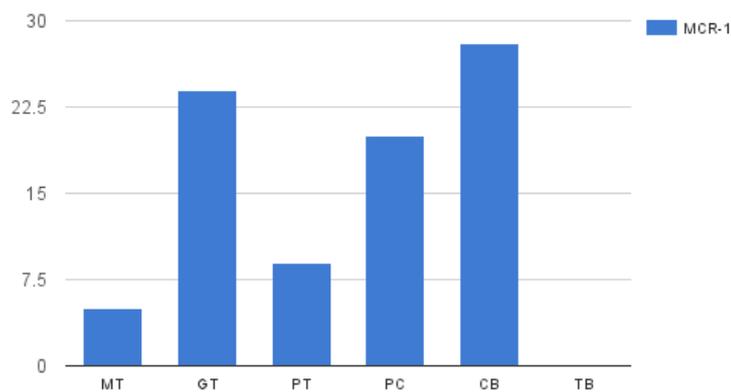


Figure 17. Resistencia a colistin identificado por área. MT: Montas, GT: Gestantes, PT: Partos, PC: Pre-ceba, CB: Ceba y TB: trabajadores

En estas cepas resistentes se evaluó la presencia del gen *MCR-1*, el cual se identificó en 97% (84/86) de las cepas estudiadas, en todas las áreas analizadas.

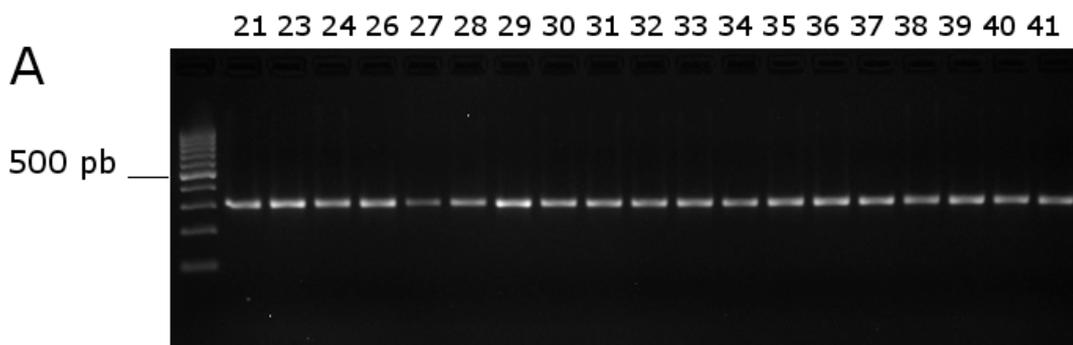


Figure 18. Resistencia a Colistin. A. Productos de PCR de la amplificación del gen *mcr1*, peso esperado 309 pb, separados por electroforesis en un gel de agarosa.

## Resistencia a Quinolonas

De los aislamientos de *E. coli* y *E. faecalis* 19/104 y 12/32 respectivamente son resistentes a ciprofloxacina. Niveles de resistencia altos a quinolonas en bacterias Gram negativas están asociados con mutaciones en los genes que codifican para las subunidades A y B de la girasa (*gyrA* y *gyrB*), en particular *gyrA*. Con menos frecuencia se han descrito mutaciones en la subunidades de la topoisomerasa IV *parC* y *parE*. En Gram positivos la topoisomerasa IV es el principal blanco de acción, y las mutaciones que confieren resistencia a quinolonas en estos microorganismos ocurren en *parC* y se concentran en una región denominada QRDR (región determinante de resistencia a quinolonas).

De los 19 aislamientos de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina, 7 presentaban valores CMI de 1 ug/mL, 4 de 2ug/mL y 8 fueron > 4ug/mL. En *E. faecalis* 12 fueron resistentes a ciprofloxacina con valores de CMI > 8ug/mL (tabla 24). La presencia de mutaciones en genes cromosomales por pruebas fenotípicas fueron evaluadas, acorde con las recomendaciones hechas por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (SEIMC) (Calvo, et al., 2011). En los aislamientos con valores de CMI > 4mg/mL se identificaron resistencias a ácido nalidíxico y ciprofloxacina, lo que sugiere mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*. Los resultados de secuenciación confirman estos hallazgos. En *E. coli* se encontraron además mutaciones en las subunidades A y B de la DNA girasa.

Tabla 24. Resistencia a quinolonas en los aislamientos en estudio

Resistencia a ciprofloxacina										
Microorganismo	Montas (n=5)	Gestantes (n=30)	Partos (n=13)		Pre-ceba (n=23)		Ceba (n=29)		Trabajadores (n=4)	Total n (%)
	AN	AM	AN	AM	AN	AM	AN	AM	HR	
<i>E. coli</i> (n=104)	1	2	0	0	3	8	2	3	0	19 (18)
<i>E. faecium</i> (n=15)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)
<i>E. faecalis</i> (n=32)	0	0	0	0	2	8	1	2	0	12 (38)
<i>S. aureus</i> (n=5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0%)

AN: muestras de animales, AM: muestras ambientales, HR: hisopado rectal

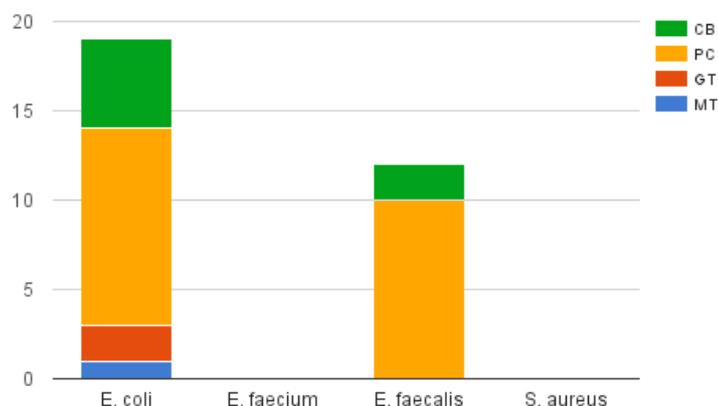


Figure 19. Resistencia a quinolonas en los aislamientos en estudio. MT: Montas, GT: Gestantes, PT: Partos, PC: Pre-ceba, CB: Ceba y TB: trabajadores

En el total de las muestras resistentes se evaluó la presencia de los genes de resistencia descritos a nivel plasmídico *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qnrD*, *qepA*, *oqxA*, *oqxB* y *aac(6')-Ib*, utilizando como controles positivos dos cepas denominadas OPS 201 y 209 proporcionadas por el grupo de resistencia a antimicrobianos de CORPOICA. Sólo se identificaron los genes *qnrB* en 9 aislamientos de *E. coli* analizados, que presentaban valores de CMI de 1 y 2 mg/L. Para los de *E. faecalis* estudiados no se identificó ninguno de los genes evaluados. La resistencia identificada es causada por mutaciones en la subunidades A y B de la topoisomerasa IV.

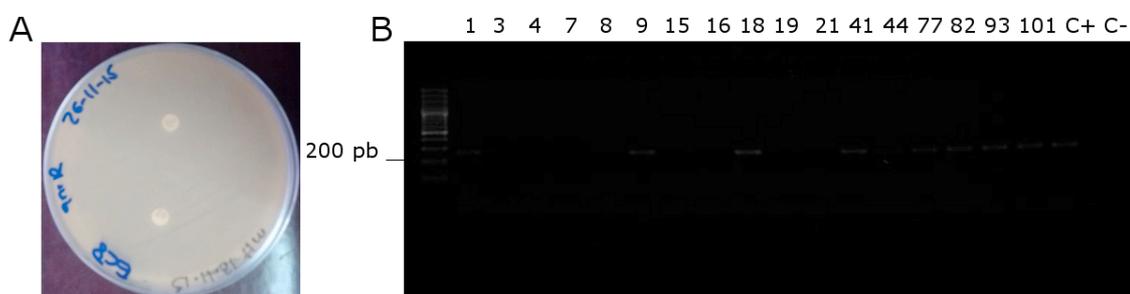


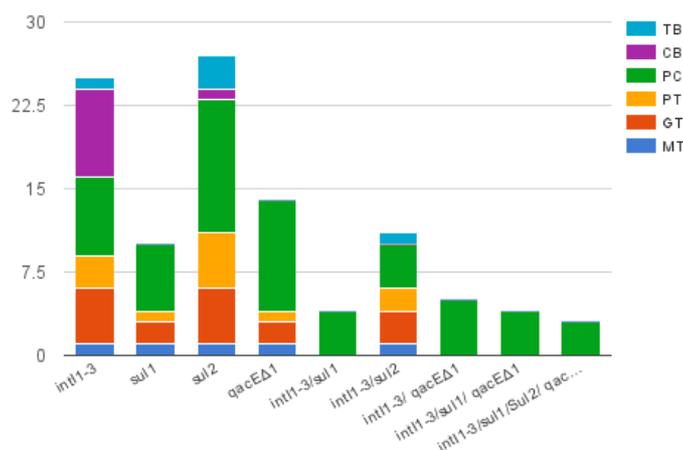
Figure 20. Resistencia a quinolonas. A. Prueba de dilución en agar, cepa *E. coli* EC8 sugestiva de mutación a nivel cromosomal por su perfil de resistencia a ciprofloxacina (6 mm) y ácido nalidíxico (6mm). B. Productos de PCR de amplificación del gen *qnrB*, peso esperado 264 pb, separados por electroforesis en gel de agarosa.

## Detección de integrones y Resistencia a sulfonamidas

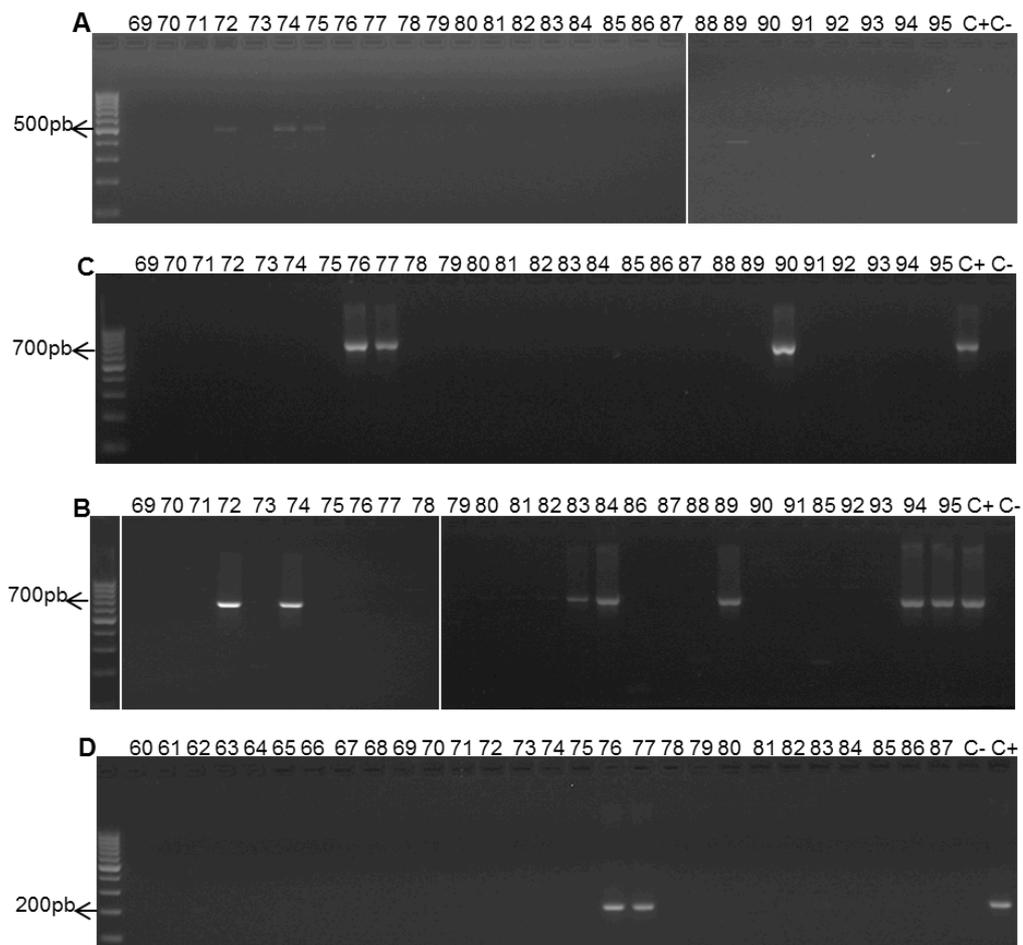
40% de los aislamientos de *E. coli* son resistente a trimetropin sulfametoxazol, que se asocia a la presencia de los genes *dfrA*, *sul1*, *2* y *3*, identificados en integrones tipo 1, 2 y 3. Así mismo, la presencia de integrones tipo 1, 2 y 3, fue analizada en las 104 muestras de *E. coli* recuperadas, identificándose el gen que codifica para *int1-3* en 24% (n=25), *Sul1* en 9,6% (n=10), *Sul2* en 26% (n=27), y *qacEΔ1* en 13,5% (n=14). Las combinaciones *int1-3* y *Sul1* se identificó en 4, *int1-3* y *Sul2* en 11, *int1-3* y *qacEΔ1* en 5, y *int1-3*, *Sul1*, *Sul2* y *qacEΔ1* para 3.

Tabla 25. Frecuencia de genes *int1-3*, *sul1-2* y *qacE1* en *E. coli*

Frecuencia de genes <i>Int1-3</i> , <i>sul 1-2</i> y <i>qacEΔ1</i> en <i>E. coli</i>							
Microorganismo	Montas (n=5)	Gestantes (n=30)	Partos (n=13)	Pre-ceba (n=23)	Ceba (n=29)	T (n=4)	Total n (%)
<i>int1-3</i>	1	5	3	7	8	1	25(24)
<i>sul1</i>	1	2	1	6	0	0	10(9)
<i>sul2</i>	1	5	5	12	1	3	27(26)
<i>qacEΔ1</i>	1	2	1	10	0	0	14(13)
<i>int1-3/sul1</i>	0	0	0	4	0	0	4(4)
<i>int1-3/sul2</i>	1	3	2	4	0	1	11(11)
<i>int1-3/ qacEΔ1</i>	0	0	0	5	0	0	5(5)
<i>int1-3/sul1/ qacEΔ1</i>	0	0	0	4	0	0	4(4)
<i>int1-3/sul1/Sul2/ qacEΔ1</i>	0	0	0	3	0	0	3(3)



**Figure 21.** Frecuencia de genes *int1-3*, *sul1-2* y *qacE1* en *E. coli*



**Figure 22.** Integrones identificados y genes de resistencia a sulfonamidas. A. Productos de PCR de la amplificación del gen *int123*, peso esperado 491 pb, separados por electroforesis en gel de agarosa. B Productos de la amplificación del gen *sul1*, peso esperado 789 pb. C. Bandas de la amplificación del gen *sul2*, peso esperado 722pb. D. Amplificación del gen *qacΔ*, peso esperado 274 pb.

## Plásmidos y grupos de incompatibilidad

La resistencia a antibióticos puede estar codificada a nivel cromosomal o plasmídico; algunos de los genes identificados han sido reportados en plásmidos portadores de múltiples genes de resistencia, por lo cual se evaluaron los grupos de incompatibilidad presentes en las cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas de tercera generación), quinolonas (ciprofloxacina) y polimixinas (colistin), para un total de 17 aislamientos seleccionados. Con el fin de determinar qué grupos de incompatibilidad son más frecuentes en la granja en estudio. Los resultados obtenidos se describen en la [tabla 25](#).

**Tabla 26.** Frecuencia de genes de resistencia y grupos de incompatibilidad en aislamientos de *E. coli* multirresistentes por área

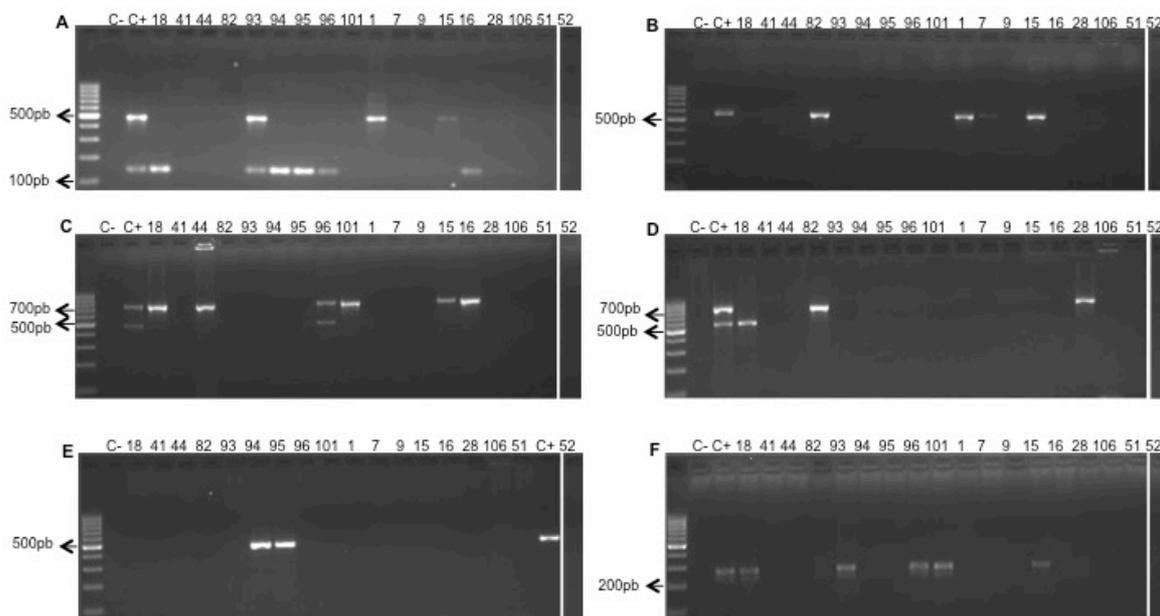
Frecuencia de grupos de incompatibilidad plasmídicos y genes asociados por área							
Microorganismo	Montas (n=1)	Gestantes (n=1)	Partos (n=3)	Pre-ceba (n=6)	Ceba (n=4)	T (n=2)	Total n=17 n (%)
<i>qnrB</i> (n=9)	1	1	0	3	4	0	9(53)
<i>TEM-1</i> (n=5)	0	0	0	4	1	0	5(29)
<i>OXA-1</i> (n=2)	0	0	0	0	0	2	2(12)
<i>CTX-M</i> (n=1)	0	0	0	1	0	0	1(6)
<i>Amp C</i> <i>CMY-12</i> (n=3)	0	0	3	0	0	0	3(18)
<i>MCR-1</i> (n=12)	1	1	1	5	4	0	12(71)
<i>Int 1-3</i> (n=4)	0	0	0	3	0	1	4(24)
<i>Sul1</i> (n=1)	0	0	0	1	0	0	1(6)
<i>Sul2</i> (n=7)	0	0	2	3	0	2	7(41)
<i>qacEΔ1</i> (n=4)	0	0	0	4	0	0	4(24)
<i>Incl1</i> (n=6)	1	0	3	2	0	0	6(35)
<i>IncHI1</i> (n=3)	1	0	0	2	0	0	3(18)
<i>IncN</i> (n=9)	0	1	3	3	0	2	9(53)
<i>IncFIA</i> (n=1)	0	1	0	0	0	0	1(6)
<i>IncFIB</i> (n=6)	0	1	0	3	2	0	6(35)
<i>IncY</i> (n=1)	0	1	0	0	0	0	1(6)
<i>IncP</i> (n=1)	0	0	0	1	0	0	1(6)
<i>IncA/C</i> (n=2)	0	2	0	0	0	0	2(12)
<i>IncF</i> (n=5)	1	0	1	2	1	0	5(29)

T: Trabajadores

Como se observa en la [figura 15](#), en los 17 aislamientos analizados los genes más frecuentes son *MCR-1* 71% (n=12), *qnr B* 53% (n=9), *Sul 2* 41% (n=7), *TEM-1* 29% (n=5) y *qacEΔ1* 24% (n=4), siendo pre-ceba el área donde se encuentran con mayor frecuencia. En cuanto a grupos de incompatibilidad *IncN* es el más frecuente 53% (n=9), seguido por *IncFIB* 35% (n=6), *Incl1* 35% (n=6), e *IncF* 29% (n=5), siendo pre-ceba nuevamente el área donde se encuentran con mayor frecuencia.

En el análisis de una cepa del área de montas, se encontraron los genes *qnrB*, *MCR-1* y los plásmidos de los grupos de incompatibilidad *Incl1*, *IncHI1* e *IncF*. Para el área de gestantes una cepa presenta los genes *qnr B* y *MCR-1* y los grupos de *IncN*, *FIA*, *FIB*, Y *A/C*. Pasando al área de partos 3 cepas tienen los genes de resistencia *CMY-2*, *MCR-1* y *Sul2* y grupos de incompatibilidad *IncN* y *IncF*. En pre-ceba se analizaron 6 cepas con los genes de resistencia *qnrB*, *TEM-1*, *CTX M-1*, *MCR-1*, *Int1-3*, *Sul 1*, *Sul2* y *qacEΔ1* y grupos de incompatibilidad *Incl1*, *IncHI1*, *IncN*, *IncFIB*, *IncP*

y *IncF*. En ceba 4 cepas expresan los genes de resistencia *qnrB*, *TEM-1*, *MCR-1* y grupos de incompatibilidad *IncFIB* y *IncF*. Finalmente de las cepas aisladas de trabajadores 2 de ella presentan los genes de resistencia *OXA-1*, *Int1-3*, *Sul 2* y el grupo de incompatibilidad *IncN*.



**Figure 23.** Amplificación de grupos de incompatibilidad de plásmidos basados en [Carattoli, et al., 2005](#). A. Grupos HI1, I1 y H2, bandas de pesos esperados de 471, 139 y 644 pb respectivamente. B. Grupos X, N y L/M, bandas de pesos esperados de 376, 599 y 785 pb respectivamente. C. Grupos FIA, FIB y W, pesos esperados de 462, 702 y 242 pb respectivamente. D. Grupos Y, P y FICF, pesos esperados de 765, 534 y 262 pb respectivamente. E. Grupos A/C, T y FIIA, pesos esperados de 465, 750 y 270 pb respectivamente. F. Grupo F, peso esperado de 270 pb.

## Resistencia a Oxazolidina y fenicoles en *E. faecium* y *E. faecalis*

Se identificó el gen *OptrA* en uno de los aislamientos secuenciados, este gen es de importancia clínica ya que confiere resistencia transferible a oxazolidinas (linezolid y tedizolid) y a fenicoles (cloranfenicol y florfenicol), además es última opción terapéutica para el tratamiento de infecciones por *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a vancomicina.

El gen en estudio no se identificó en los aislamientos de *E. faecium* analizados, en *E. faecalis* se identificó en 15/45 cepas estudiadas [Tabla 27](#).

**Tabla 27.** Aislamientos de *Enterococcus faecalis* portadores del gen *OptrA* identificados por área

Aislamientos de <i>Enterococcus faecalis</i> portadores del gen <i>OptrA</i> identificados por área							
Gen	Montas (n=4)	Gestantes (n=11)	Partos (n=9)	Pre-ceba (n=11)	Ceba (n=8)	T (n=2)	Total (n=45)
<i>OptrA</i> (n=15)	0	0	2	8	5	0	84 (81%)

AN: animales, AM: ambiente, HR: hisopado rectal, T: Trabajadores

Como se observa en la [tabla 27](#) el gen es identificado en el área de partos, pre-ceba y ceba donde se ha reportado mayor uso de antibióticos, a pesar de esto en ninguna de estas áreas fue reportado el uso de oxazolidionas o fenicoles.

## Resultados Análisis estadístico

### Modelos aplicados para evaluar la relación entre el uso de antimicrobianos en la granja y la resistencia a dos o más antibióticos en los aislamientos de *E. coli*.

Se evaluó el efecto del uso de ceftiofur, quinolonas, sulfonamidas, amoxicilina, macrólidos, tetraciclina en la granja, por áreas y la respuesta de resistencia identificada en 19/23 antibióticos evaluados. Se encontró un efecto altamente significativo ( $p=0,00012$ ) entre el uso de antibióticos en las áreas del grupo PCPT (partos, pre-ceba, ceba) y la multiresistencia identificada, y un efecto significativo ( $p=0,0397$ ) entre el uso de quinolonas para profilaxis y la resistencia a los antibióticos evaluados ([Tabla 28](#)). No se encontró un efecto significativo entre otros antibióticos utilizados y la resistencia identificada, la razón de esto puede ser por la poca variabilidad de los datos, como es el caso del uso de pre-mezcla que tuvo que ser excluida de análisis.

**Tabla 28.** Resultados de los modelos aplicados para evaluar la relación entre el uso de antimicrobianos y la resistencia a dos o más antibióticos en los aislamientos de *E. coli* con un efecto identificado

Tipo de modelo y variable respuesta	Variables analizadas	Estimate std.	Error	Z value	P value
Modelo 1: Poisson	Intercepto	1.14046	0.09054	12.597	$< 2e-16^{***}$
Resistencia a dos o más antibióticos	Uso de antibióticos en las áreas de PCPT	0.43999	0.11445	3.844	0.000121 <sup>***</sup>

Resistencia a dos o más antibióticos	Uso de quinolonas para profilaxis	0.22570	0.10975	2.056	0.039735*
--------------------------------------	-----------------------------------	---------	---------	-------	-----------

### Modelos aplicados para evaluar la relación entre el uso de antimicrobianos en la granja y los genes de resistencia identificados en los aislamientos de *E. coli*.

Se evaluó la relación entre el uso de ceftiofur, quinolonas, sulfonamidas, amoxicilina en la granja y los genes *qnrB*, mutaciones en los genes *GyrA* y *ParC*, *bla<sub>TEM</sub>*, *Int1-3*, *Sul1*, *Sul2*, *Sul3* y *qacΔ* identificados en los aislamientos de *E. coli* analizados. Se encontró un efecto significativo ( $p=0,0469$ ) entre el uso de quinolonas para profilaxis y la presencia de los genes *qnrB*, además entre las áreas de PCPT y la presencia de los genes *bla<sub>TEM</sub>* ( $p=0,0177$ ), [Tabla 29](#).

**Tabla 29.** Resultados de los modelos aplicados para evaluar la relación entre el uso de antimicrobianos y los genes de resistencia identificados en los aislamientos de *E. coli* con un efecto identificado

Tipo de modelo y Variable respuesta	Variables analizadas	Estimate std.	Error	Z value	P value
Modelo 2: Logístico	Intercepto	-1.2528	0.2673	-4.687	2.77e-06***
Uso de quinolonas para profilaxis	Gen <i>qnrB</i>	0.9904	0.4983	1.987	0.0469*
Modelo 3: Logístico	Intercepto	-21.57	3248.05	-0.007	0.995
Uso de quinolonas para profilaxis	Mutación en los genes <i>GyrA</i> y <i>parC</i>	20.74	3248.05	0.006	0.995
Modelo 4: Poisson 0(sensible), 1(presencia del gen), 2 (ausencia del gen)	Intercepto	-0.8109	0.5000	-1.622	0.1048
Uso de ceftiofur para profilaxis	Gen <i>bla<sub>TEM</sub></i>	-0.7856	0.6338	-1.240	0.2152
Uso de amoxicilina para tratamiento	Gen <i>bla<sub>TEM</sub></i>	0.3001	0.5528	0.543	0.5872
Uso de antibióticos en las áreas de PCPT	Gen <i>bla<sub>TEM</sub></i>	1.2164	0.5127	2.373	0.0177*

Por último se identificó un efecto altamente significativo ( $p= 7.29e- 06$ ) entre la resistencia a dos o más antibióticos, las áreas de PCPT y la presencia de los genes *qacΔ* ( $p=0.00591$ ) (Tabla 30).

**Tabla 30.** Resultados de los modelos aplicados para evaluar la relación entre la resistencia a dos o más antimicrobianos y los genes de resistencia *Int1-3*, *Sul1*, *Sul2*, *qacΔ* y el uso de sulfonamidas en los aislamientos de *E. coli* con un efecto identificado

Tipo de modelo y Variable respuesta	VARIABLES analizadas	Estimate std.	Error	Z value	P value
Modelo 5: Poisson	Intercepto	1.09341	0.09583	11.409	< 2e-16***
Resistencia a dos o más antibióticos	en el área de PCPT	0.49947	0.11136	4.485	7.29e-06***
Resistencia a dos o más antibióticos	Genes <i>Int1-3</i>	0.12053	0.10641	1.133	0.25734
Resistencia a dos o más antibióticos	Gen <i>Sul1</i>	-0.42764	0.22297	-1.918	0.05512
Resistencia a dos o más antibióticos	Gen <i>Sul2</i>	0.07290	0.10838	0.673	0.50120
Resistencia a dos o más antibióticos	Gen <i>qacΔ</i>	0.50867	0.18479	2.753	0.00591***
Resistencia a dos o más antibióticos	Uso de sulfamidas para profilaxis	-0.17974	0.14855	-1,210	0.22630

## Conclusiones

Habiendo establecido la presencia de resistencia a antibióticos previamente y su asociación con el uso de antimicrobianos, en este capítulo se exploraron los orígenes moleculares que explican los fenotipos detectados. Se encuentran genes cromosomales y extracromosomales asociados que sustentan la expresión de proteínas asociadas con resistencia.

Además los datos sugieren que hay diseminación de cepas entre áreas, que puede explicarse por contacto directo e indirecto. Este último aspecto es interesante porque sugiere la razón de contaminación de alimento (concentrado) encontrada.

Se identificaron también grupos clonales con diferentes perfiles de resistencia lo que sugiere circulación de elementos genéticos portadores de genes responsables de estos perfiles.

El análisis estadístico muestra un efecto altamente significativo entre la resistencia a antimicrobianos identificada en la granja en estudio y el uso de antimicrobianos en especial en las áreas de pre-ceba, ceba y partos. En cuanto a resistencia específicas solo se identificó una relación directa entre el uso de quinolonas y la presencia de los genes qnrB.

# Capítulo 5

## Confirmación de la resistencia antimicrobiana en la granja de estudio

### Mecanismos de resistencia antimicrobiana

La resistencia a antibióticos es explicada por diferentes mecanismos que involucran procesos fisiológicos de bacterias en diferentes niveles. Entre ellos se incluye la modificación enzimática y transporte. La modificación enzimática se puede dar sobre el antibiótico o sobre su molécula blanco ([McDermott et al., 2003](#); [Tenover, 2006](#)). Algunas bacterias expresan enzimas capaces de alterar la estructura del antibiótico. En vista que existe una estrecha relación entre la estructura de una molécula y su función ([Anfinsen, 1972](#)), modificación o pérdida de ésta compromete la actividad antimicrobiana de estas moléculas. Las  $\beta$ -lactamasas son ejemplo de estas enzimas; hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia como penicilinas y cefalosporinas y, alteran así su efecto microbicida ([Walsh, 2003](#)). De igual forma, las enzimas modificadoras de aminoglicósidos son capaces de hidrolizar el antibiótico mediante reacciones de acetilación, adenilación o fosforilación ([Tenover, 2006](#)). Por último, pueden generar alteraciones del sitio de acción donde el antibiótico se une para interrumpir una función bacteriana vital.

Entre los mecanismos de transporte están bombas de eflujo y porinas. Las bombas de eflujo, son transportadores ubicados en la membrana celular bacteriana. En condiciones fisiológicas transportan nutrientes y/o productos de desecho del metabolismo gastando energía química en forma de ATP. Algunos antibióticos tienen estructuras similares al sustrato(s) natural, y terminan siendo reconocidos por estas bombas que permite su expulsión fuera de la bacteria evitando acumulación e interacción con el sitio de acción del antimicrobiano. Al aumentar el número de bombas por la presión antibiótica el efecto es resistencia al fármaco ([Karczmarczyk, 2011](#)).

Los datos fenotípicos y moleculares presentados previamente indican resistencia a antibióticos y asocia esta a algunos genes particulares. En este aparte se

confirmó por secuenciación de 4 cepas con un perfil de resistencia amplio la resistencia reportada.

## **Objetivos Específicos asociados**

- Establecer un modelo de resistencia a antibióticos en la granja en estudio

## **Diseño metodológico**

### **1.1.14 Secuenciación del genoma completo por Illumina MiSeq**

Se seleccionaron 4 cepas recuperadas de *E. coli*, *Enterococcus spp* y *S. aureus* con perfiles de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, colistin, quinolonas (cromosomal y plasmídica), cefalosporinas y aminoglicósidos para secuenciación del genoma completo, con el objetivo de determinar los genes de resistencia asociados a los perfiles de resistencia identificados.

La extracción de DNA de las muestras seleccionadas se realizó con el *Kit QIAmp DNA*, QIAGEN, se evaluó la concentración y pureza por espectrofotometría (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific). Las muestras fueron enviadas al *Internacional Center for Microbial Genomics*, Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA), Universidad El Bosque, para secuenciación.

El DNA extraído fue cuantificado por fluorometría (Fluorómetro Qubit 2.0). La preparación de las librerías genómicas se realizó con el *kit* comercial Nextera XT (Illumina), según las indicaciones del fabricante. Las librerías obtenidas fueron verificadas por fluorometría y con el sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent) para su posterior normalización. La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina usando el equipo MiSeq, para obtener secuencias pareadas de 250 nucleótidos. Estas secuencias pareadas fueron filtradas y cortadas por calidad, descartando aquellas con valores phred menores a 20, contaminación con secuencias de los elementos usados en la preparación de las librerías o longitud menor de 50 nucleótidos. Posteriormente se hicieron ensamblajes *de novo* empleando el programa CLC Genomics Workbench (Qiagen) versión 8.5.1. Los genomas armados fueron anotados con la herramienta *Rapid Annotation using Subsystem Technology*, RAST, versión 2.0.

## Resultados

Los datos de secuenciación se recibieron como datos crudos, ensamblajes *de novo* en *scaffolds* y *contigs*, y resultados iniciales de anotación. Estos datos fueron analizados de con las herramientas *Rapid Annotation using Subsystem Technology*, RAST versión 2.0 y *Pathosystems Resource Integration Center*, PATRIC.

Los datos de la cepas enviadas se relacionan a continuación (Tabla 31). Los resultados de secuenciación, confirman género y especie de las 4 cepas mediante análisis de la subunidad 16S.

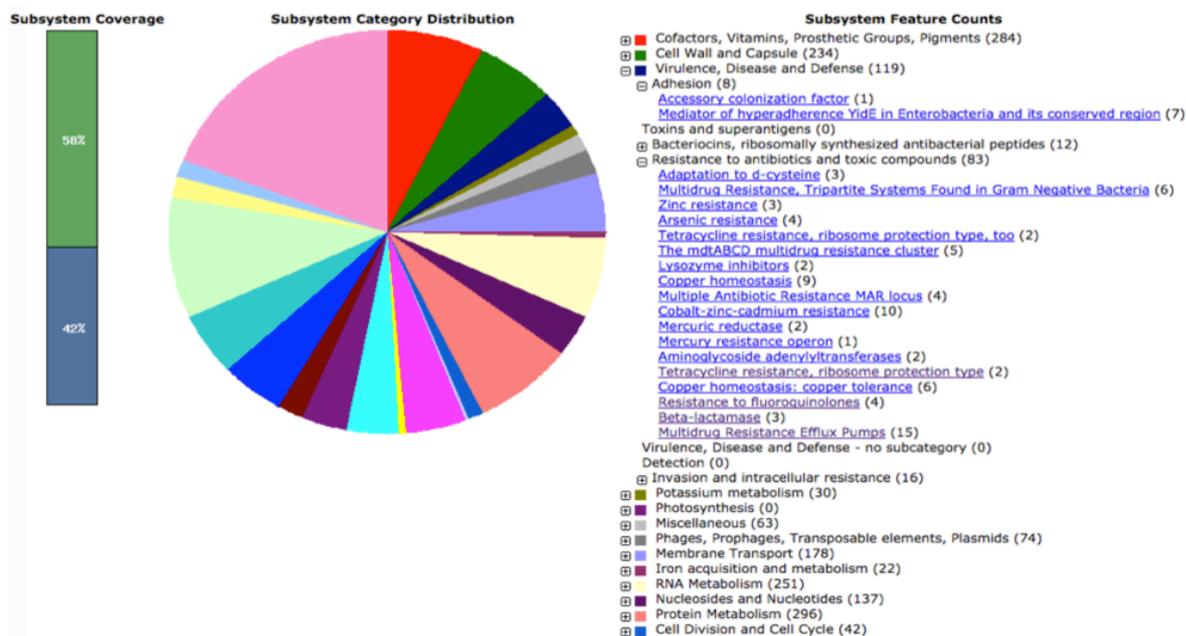
Tabla 31 Tipo de cepa circulante analizada por secuenciación

Cepa enviada	ST	ID por 16S
<i>E. coli-1</i>	746	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli-16</i>	617	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis-46</i>	16	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>S. aureus-14</i>	9	<i>Staphylococcus aureus</i>

### Propiedades de genoma *Escherichia coli* #1

Su genoma completo está compuesto por 4,9 Mb (4,931,465) con 5 plásmidos de los grupos de incompatibilidad *IncHI2A*, *IncN*, *IncX1*, *IncHI2*, *p0111* con porcentajes de identidad de 99,52%, 100%, 98,94%, 100% y 98,53% respectivamente.

Se identifican 595 subsistemas, 119 de los cuales son clasificados en la categoría de virulencia, enfermedad y defensa, y 83 están asociados con resistencia a antibióticos y otros componentes tóxicos (Figura 24). Los genes de resistencia identificados fueron cotejados comparando los *contigs* contra bases de datos exclusivas para el análisis de genes de resistencia ARDB.



**Figure 24.** Análisis de secuencias de *E. coli* # 1 por subsistemas. Dentro de los subsistemas contemplados el asociado con virulencia, enfermedad y defensa en azul oscuro, incluyen genes de resistencia a antibióticos. En el listado se presentan estos.

En el genoma *E. coli* # 1 se encuentran los genes *cml-e3* y *mdt1*, que codifican para bombas de eflujo que confieren resistencia a cloranfenicol, con un porcentaje de identidad con las reportadas de 91,34% y 97,11% respectivamente. La resistencia a  $\beta$ -lactámicos, se explica por el gen *bla*<sub>TEM-1B</sub>, 100% de identidad. La resistencia a tetraciclina está codificada por los genes *tet(A)* y *tet(M)* con identidades de 100 y 99,9%. Los genes asociados con resistencia a aminoglicósidos son *Stra* y *B*, *aph(3')-Ic*, *aadA2*, con porcentajes de identidad de 100, 99,14 y 99,87% respectivamente. La presencia del gen *drfa12*, dehidrofolato reductasa, 100% de identidad, explica la resistencia a trimetoprim. En el caso de la resistencia detectada para quinolonas se asocia a nivel cromosomal con mutaciones de las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV y a nivel plasmídico con el gen *qnrB19*, que protege la DNA girasa impidiendo la acción de quinolonas, con una identidad de 100%. Más aún, el gen *mcr-1*, 100% de identidad, que confiere resistencia a colistina, está presente. Se identifican también los genes que codifican para las proteínas MarA, B, C y R que confieren multiresistencia a antibióticos, 100% de identidad y por último el gen que codifica para la integrasa 1, 99% de identidad.

La información de secuenciación que es confirmatoria, es concordante con lo detectado por PCR, donde se habían identificado los genes *bla*<sub>TEM1B</sub>, *mcr-1*, *qnrB19* y *Int1*. Con esta metodología se habían identificado sólo 2 grupos de incompatibilidad de los 5 identificados por secuenciación.

Por análisis bioinformático del ambiente genético en la cepa 1 no identificamos relación entre los genes y los plásmidos identificados, corriente arriba del gen *mcr-1* se encontró la secuencia de inserción *ISApII* reportada por (Liu et al., 2016).

## Propiedades del genoma de la cepa *E. coli* #16

Esta genoma completo está compuesto de 5,1 Mb (5,098,4881), con 3 plásmidos de los grupos de incompatibilidad *IncI1*, *IncX1* e *IncFIB* identificados en los *contigs* 169 (15083-15224), 34 (216-589), 147 (2229-2910), con porcentajes de identidad de 97,89%, 98,83%, 97,65%.

Se compone de 596 subsistemas, 122 clasificados en la categoría de virulencia, enfermedad y defensa, de los cuales 89 están asociados con resistencia a antibióticos y otros componentes tóxicos (Figura 25). En estos genes se identificaron mutaciones en la DNA girasa y topoisomerasa IV que confieren resistencia a quinolonas, confirmando la resistencia identificada a este grupo de antibióticos para esta cepa.

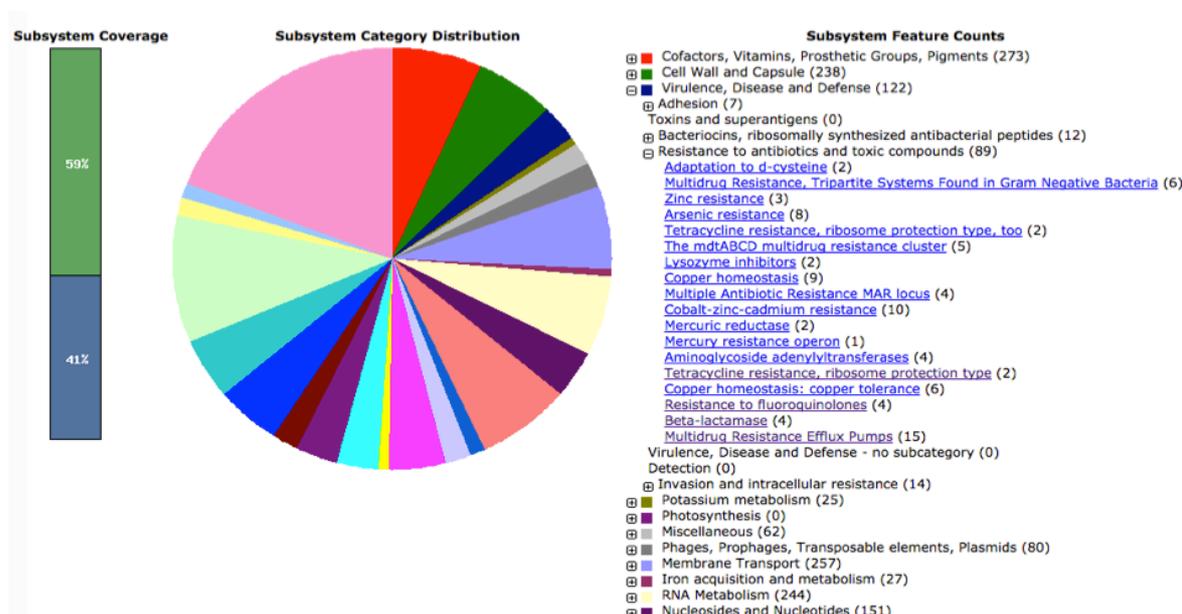


Figure 25.. Análisis de secuencias de *E. coli* # 16 por subsistemas.

Se identifican genes que confieren resistencia a tetraciclina (*tet(A)*), trimetropin (*drfa12*), y sulfonamidas (*sul2* y *3* e *integrasa 1*). Los genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas identificados son *bla TEM-1B* y *CTX-M-15* con 100% de identidad, para resistencia a aminoglicósidos *StrA* y *B*, *aadA2*, y *aac(3)-Ild* con porcentajes de identidad de 100 y 99,88% respectivamente. La resistencia a los macrólidos

lincosamida y estreptogramina B, codificada por el gen *inu(F)* con 100% de identidad. Se identifica un grupo genes que confieren multiresistencia a antibióticos que codifican para las proteínas MarA, B, C y R, 100% de identidad.

Nuevamente la información de secuenciación confirma los datos obtenidos por PCR, donde se identificaron los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTXM-15</sub>* y 2 de los 3 grupos de incompatibilidad identificados, donde se identificó resistencia a ampicilina, cefalosporinas de tercera y cuarta generación ( $\beta$ -lactámicos, quinolonas y aminoglicósidos).

Por análisis bioinformático del ambiente genético en la cepa 16 encontramos los genes *cmlA1*, *aadA2*, *drfa12* localizados en un integron 1, Los genes *StrB*, *StrA* y *Sul2* localizados en el plásmido ColRNAI. Por último el gen *bla<sub>CTX-M15</sub>* se identificó en un plásmido del grupo de incompatibilidad IncI1. No se encontró relación entre los genes *bla<sub>TEM</sub>* y los plásmidos identificados.

## Propiedades del genoma *E. faecalis* # 46

El genoma completo está compuesto de 2,9 Mb (2,954,530). Se detectan 361 subsistemas, 61 clasificados en la categoría de virulencia, enfermedad y defensa, de los cuales 41 están asociados con resistencia a antibióticos y otros componentes tóxicos (Figura 26). Se identificaron genes de inicio de replicación de plásmidos presentes en bacterias Gram positivas como *rep9*, *rep1*, *rep22* y *rep US12* con identidad de 97, 99, 100 y 99,6% respectivamente.

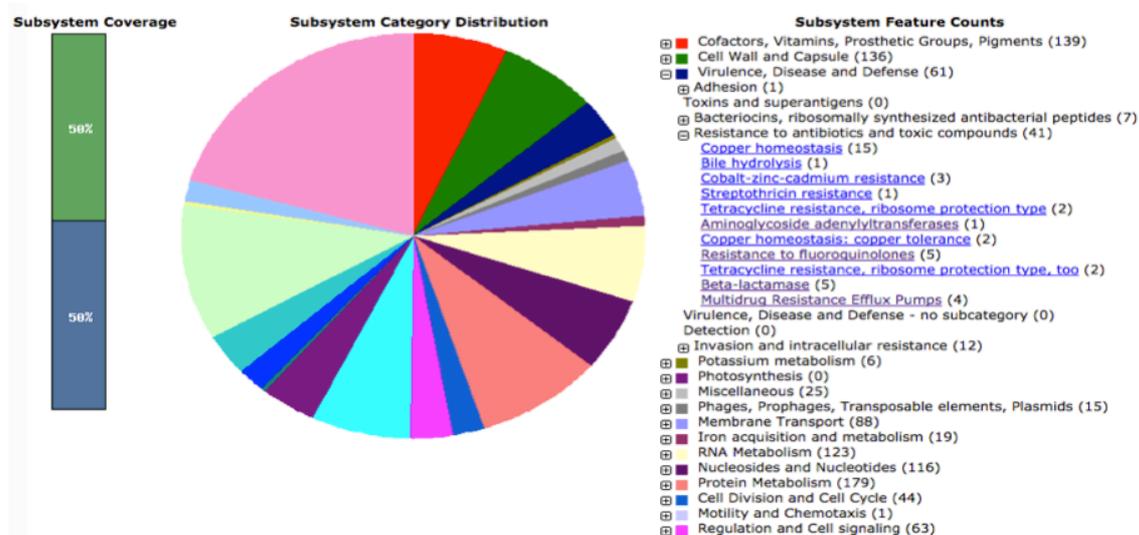


Figure 26.. Análisis de secuencias de *E. faecium* #46 por subsistemas.

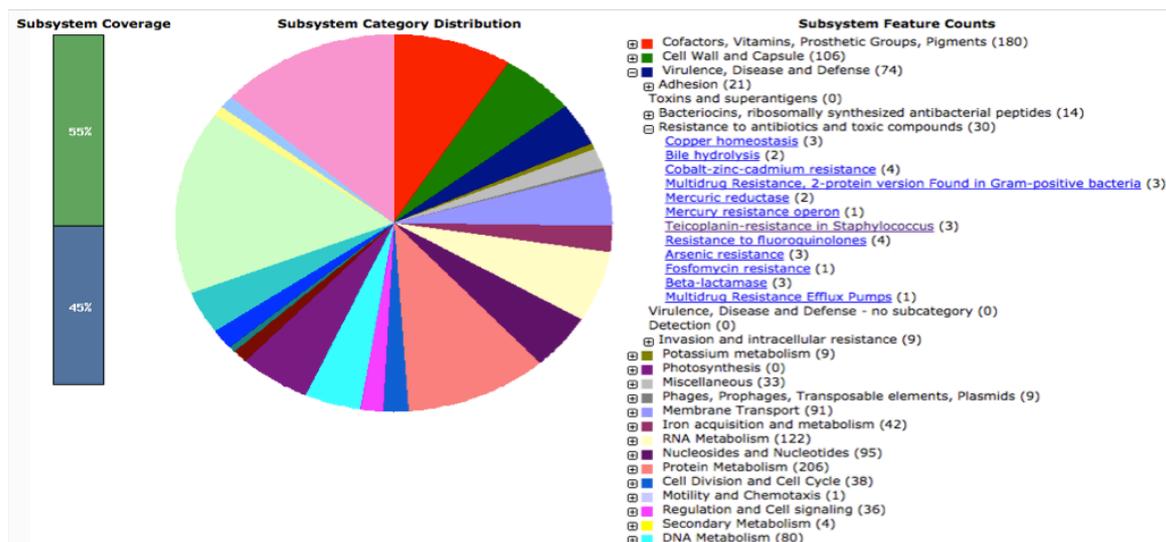
Mutaciones en las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV que confieren resistencia a quinolonas, confirmando la resistencia identificada a quinolonas en esta cepa. Además se identificaron genes que confieren resistencia a tetraciclina (*tet(L)*), trimetropin (*drfG*), oxazolidiona y fenicol codificadas por los genes *optrA*, *fexA* y *cat* con identidades de 100, 100, 99,9, 99,86 y 98,82% respectivamente. Además la resistencia a los macrólidos lincosamida y estreptogramina B, está codificada por los genes *lsa(A)*, *inu(B)*, *erm(B)*, *erm(A)* con identidades de 98,9, 99,8, 100 y 100% respectivamente. Así mismo los genes asociados con resistencia a aminoglicósidos *aph(3')-III*, *aac(6')-aph(2')* y *ant(6)-Ia* con de identidades de 100%, están presentes..

Los datos reportados en capítulos anteriores, donde se identificó resistencia a eritromicina (macrólido), estreptomina y gentamicina de de alta carga (aminoglicósidos), levofloxacin y ciprofloxacina (quinolonas), minociclina y tetraciclina (tetraciclinas) son confirmados por secuenciación.

Por análisis bioinformático del ambiente genético en la cepa 46 no identificamos relación entre los genes y los plásmidos identificados, corriente arriba del gen *optrA* se encontró el regulador transcripcional *araC* reportada por (He et al., 2016)

### **Propiedades de genoma de *S. aureus* # 14.**

Para este genoma se identificaron 395 subsistemas, 74 clasificados en la categoría de virulencia, enfermedad y defensa, de los cuales 30 están asociados con resistencia a antibióticos y otros componentes tóxicos (Figura 27). Los genes de inicio de replicación de plásmidos presentes en bacterias Gram positivas *rep7* y *rep10b* con identidades de 99,25 y 96,77% respectivamente, están presentes.



**Figure 27..** Análisis de secuencias de *S. aureus* # 14 por subsistemas

Se identifican genes que confieren resistencia a tetraciclina (*tet(K)*, identidad 100%), a los macrólidos lincosamida y estreptogramina B (*vga(A)*, identidad 99,3%), a  $\beta$ -lactámicos (*blaZ*, identidad 99,88%) y acorde con lo evidenciado en antibiogramas y pruebas moleculares.

Por análisis bioinformático del ambiente genético en la cepa 14 solo encontramos los genes *vga(A)* localizados en el plasmido rep10b.

## Conclusión

Los datos de secuenciación confirman la presencia de los genes identificados por PCR, apoyando en forma contundente con la hipótesis inicial de este trabajo que proponía que el uso de antibióticos, induce presión selectiva que promueve la aparición y mantenimiento de resistencia a antimicrobianos.

## Capítulo 6

### Discusión: Modelo de Resistencia a antimicrobianos y Propuesta de vigilancia

Desde 1999 a la fecha, la OMS junto con otras instituciones como el Centro para control y prevención de enfermedades (CDC), la Administración de medicamentos y alimentos (FDA) e institutos nacionales de Salud, han generado una serie de alertas y planes para controlar y combatir la resistencia a antimicrobianos. En 2001 se plantearon una serie de estrategias que hasta la fecha sólo se han llevado a cabo en países desarrollados, por contar con sistemas de vigilancia activos, políticas públicas para uso de antibióticos en medicina animal y humana, y guías de manejo para tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos, lo debería disminuir la presión antibiótica ejercida en el ambiente clínico y comunitario (EUROPE, 2011; WHO, 2009). Aunque estos planes fueron proyectados para implementarse a nivel global, Colombia se mantiene rezagado por falta de voluntad política para estudiar el problema, sistemas de competentes para monitorear y vigilar y toma de decisiones para mitigar su impacto.

Dentro de las estrategias planteadas, se promueve el uso prudente de antibióticos a través de muchos sectores, el fortalecimiento de sistemas de vigilancia para monitorear el uso de antibióticos y la resistencia expresada, y la instauración de un proyecto de ley que regule el uso de antimicrobianos en los sectores de interés, y si es necesario, la restricción y hasta prohibición de cierto tipo de antibióticos. Por último, se plantea la necesidad de desarrollar y apoyar estudios que proporcionen datos comparables de la emergencia y diseminación de resistencia a antibióticos en los diferentes sectores de interés y el desarrollo de estrategias alternativas a la terapia antibiótica (Cars, 2005; EUROPE, 2011; Organization, 2009)

Resultado de esto es la implementación de programas de vigilancia de uso de antimicrobianos y resistencia en bacterias de animales, comida y humanos como el Programa danés de investigación y monitoreo de resistencia antimicrobiana (DANMAP), el Programa canadiense de vigilancia de resistencia a antimicrobianos (CIPARS) y el Sistema de monitoreo de resistencia antimicrobiana nacional (NARMS) en Estados Unidos. La información generada por estos sistemas de vigilancia sobre

patógenos de humanos y animales, bacterias zoonóticas y microbiota de humanos y animales, permite estudiar asociaciones causales entre el uso de antimicrobianos y resistencia a antibióticos, para identificar rutas de transmisión, áreas para estudios futuros y formas de intervención ([Carlsson, 2012](#); [Government of Canada, 2012](#)).

En el Colombia, diferentes estudios muestran que la resistencia a antimicrobianos es muy alta en bacterias zoonóticas aisladas de la cadena avícola, presentando niveles de resistencia de 96% para tetraciclina, 74% para ceftiofur y 85% para ciprofloxacina ([Donado-Godoy, et al., 2012, 2015](#)), siendo muy superior a lo reportado por otros países de la región y Dinamarca, donde este fenómeno es para tetraciclina de 47%, ceftiofur 0% y ciprofloxacina 0% ([Carlsson, 2012](#); [Agerso, 2010](#)). De estos antibióticos, ceftiofur y ciprofloxacina deberían ser usados únicamente en humanos, pero en Colombia no hay información sobre su administración en producción animal. Si bien la resistencia a antimicrobianos está asociada al uso de antibióticos en el país no se ha medido su magnitud debido a que no existen mecanismos que determinen qué cantidades y clases de antibióticos se usan y cuál es su impacto en el desarrollo del proceso de resistencia, tanto en humanos como en sistemas de producción agrícola y pecuaria. Para contener este problema es fundamental la vigilancia integrada de la misma asociada al uso de antibióticos, en la parte humana, animal y ambiental. En respuesta a esto, en 2007 se desarrolló el Programa Colombiano Piloto para la Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana (COIPARS), el cual se aplicó con éxito en la cadena avícola, con muchas limitaciones para su sostenibilidad y/o expansión a otros sectores.

Un estudio que analizó la tendencia de resistencia antibiótica en humanos durante 14 años (1997-2010), identificó cambios en la tendencia de resistencia expresada por microorganismos causantes de bacteremias, observándose disminución en la frecuencia de *S. aureus* meticilino resistente y *Enterococcus* vancomicino resistente ([Livermore, 2012](#)). En el caso de este último microorganismo, la disminución en la resistencia a vancomicina la relacionaron con las medidas correctivas tomadas en 1997 por la Unión Europea, las cuales buscaban disminuir la frecuencia de microorganismos resistentes, prohibiendo antibióticos de uso humano para producción animal ([EUROPE, 2011](#)). En 2006 se extendió esta restricción a medicamentos de uso animal relacionados estructuralmente con antimicrobianos de uso humano, teniendo en cuenta que la presión antibiótica generada por estas sustancias puede seleccionar bacterias resistentes a antimicrobianos estructuralmente similares. Un ejemplo de

esto, es la restricción que se implantó en el uso de quinolonas en acuicultura ([Alcaide et al., 2010](#); [EUROPE, 2011](#))

No obstante, se observa incremento de resistencia a fluoroquinolonas, cefalosporinas, carbapenémicos y de genes que confieren resistencia a dichos antibióticos ([Choffnes, et al., 2010](#); [Livermore et al, 2012](#)); esto señala la importancia de contar con sistemas de vigilancia integrados, que permitan analizar la tendencia de enfermedades infecciosas, microorganismos implicados y resistencia a antibióticos en animales y humanos, información que debe favorecer la toma de medidas correctivas de acuerdo a la realidad y necesidad de cada país. Así mismo, algunos estudios que establecen la frecuencia de patógenos y resistencia a antibióticos en animales de interés en el área pecuaria, muestran niveles altos de resistencia a antibióticos de uso clínico, como penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas y fluoroquinolonas; el sector pecuario más estudiado ha sido el avícola, pero en el porcícola se han encontrado bacterias patógenas y microbiota con niveles de resistencia a antibióticos mayores ([Aarestrup, et al., 2008](#); [Alcaide, et al., 2005](#); [Bettelheim, et al., 2003](#); [Jordan, et al., 2005](#); [Villegas, 2002](#))

Casi dos décadas después (14 años) de las recomendaciones planteadas por la OMS, en países como el nuestro, aún no se conoce el impacto en salud humana que ha generado el uso de antimicrobianos en producción animal. En Colombia, los sistemas de vigilancia monitorean serotipos y patrones de susceptibilidad antimicrobiana de patógenos en humanos de importancia en salud pública, enfocándose en el estudio de microorganismos causantes de Infecciones asociadas a la de atención en Salud (IAAS) ([SDS, 2014](#)). El Instituto Colombiano Agropecuario (CORPOICA), identifica, caracteriza y confirma la presencia de patógenos en la producción agropecuaria del país, datos que no siempre son reportados. El interés en la resistencia antimicrobiana se ha limitado al análisis del perfil de susceptibilidad expresado por patógenos causantes de infección en humanos ([SDS, 2014](#)), sin tener en cuenta la importancia de la resistencia expresada por patógenos provenientes de otras fuentes como animales, alimentos y la interacción entre estos.

Esto se refleja en que no hay datos publicados que determinen la tendencia del uso de antibióticos en producción animal, ni de las características fenotípicas y moleculares de bacterias que hacen parte de la microbiota intestinal y nasofaríngea de estos animales, datos que permitirían deducir asociaciones causales entre estos antibióticos y la expresión de resistencia, por la alta presión ejercida y el constante uso

de éstos en alimentos para promoción de crecimiento animal. Además, es importante determinar el riesgo al que están expuestos los trabajadores de granjas que manipulan estos animales de adquirir resistencia a antibióticos, por el contacto permanente al que se someten y por último, la contaminación ambiental que está generando la excreción de trazas de dichos antibióticos por orina y heces.

Por estas razones, este proyecto analizó el uso de antibióticos y la resistencia a antimicrobianos en bacterias indicadoras y patogénicas obtenidas de una granja porcícola, encontrando una asociación directa entre el uso de ciprofloxacina,  $\beta$ -lactámicos, polimixinas (colistin), sulfonamidas y la resistencia a estos antibióticos en las bacterias en estudio. Este estudio señala la importancia de analizar el uso de antibióticos en producción animal, y caracterizar microorganismos resistentes en los principales sistemas de producción animal, que genere información comparable con la reportada en humanos y la necesidad de implementar y mantener el sistema de vigilancia integrado propuesto por Donado ([Donado-Godoy, et al., 2015](#)).

### **Resistencia a antibióticos según el Sistema de vigilancia de resistencia a antimicrobianos (DANMAP)**

Uno de los programas de monitoreo y vigilancia de resistencia a antimicrobianos más completo es el danés (DANMAP) ([Carlsson et al, 2012](#); [Agero, 2010](#)), el cual vigila resistencia a antibióticos en animales sanos, animales enfermos, alimentos, humanos sanos y enfermos. Este programa se creó por iniciativa del ministerio de salud, el ministerio de ciencia, innovación y educación superior, el ministerio de alimentación, agricultura y pesca, el instituto nacional de alimentos y el instituto nacional veterinario. A través de estas instituciones vigilan el uso de antibióticos en diferentes niveles con el fin de generar datos comparables entre humanos y animales.

Según el último informe publicado por DANMAP en 2012, el área de producción donde se utilizaron antibióticos con mayor frecuencia en Dinamarca fue la porcícola (76%), seguida por la bovina (11%). Ellos vigilan los niveles de resistencia a antimicrobianos en bacterias zoonóticas como *Salmonella* y *Campylobacter*, patógenos que pueden desarrollar resistencia en el reservorio animal y transferirla a humanos por consumo de alimentos contaminados, comprometiendo el efecto del tratamiento de enfermedades infecciosas por bacterias resistentes.

El programa DANMAP ha incluido *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. coli* como bacterias indicadoras ya que pueden ser aisladas a partir de muestras de materia fecal de animales y humanos. Además por la fácil contaminación con estas bacterias de la carne de animales de producción durante el sacrificio. Estos microorganismos

fácilmente desarrollan resistencia a antimicrobianos en respuesta a presión selectiva. En aislamiento de *E. faecium* a partir de cerdos se identificaron altos niveles de resistencia a salinomicina (71%), tetraciclina (51%), estreptomina (35%) eritromicina (27%) y kanamicina (23%). En *E. faecalis* se encontró resistencia a tetraciclina (78%), eritromicina (44%), estreptomina (28%) y kanamicina (12%). En este estudio se incluyeron estos microorganismos. Para *E. faecium* las resistencias más altas encontradas en la granja fueron para tetraciclina (100%), eritromicina (40%), casi el doble de las descritas en el programa danés (Tabla 9). Para *E. faecalis* las resistencias encontradas son mayores a 80% para eritromicina, estreptomina y tetraciclinas (Tabla 10), superiores a las del estudio danés.

En producción animal utilizan antimicrobianos para fines profilácticos y/o terapéuticos, con beneficios para esta, incluyendo mejor salud animal, aumento en los niveles de producción y disminución de patógenos transmitidos por alimentos (Mathew et al, 2007). Más aún, algunos autores indican el uso de cantidades subterapéuticas de antibióticos como promotores de crecimiento animal (Aarestrup, et al., 2000; Butaye, et al., 2003; Marshall & Levy, 2011). A pesar de ser un concepto muy utilizado, no es claro cómo estos fármacos favorecen crecimiento animal. Algunas explicaciones propuestas son uniformidad del crecimiento, estabilización de la flora intestinal animal, mantenimiento de salud en casos de estrés (Allen, et al., 2013b). No obstante, no hay estudios que demuestren este efecto.

El uso de antibióticos para profilaxis o prevención de enfermedades cambia la ecología microbiana gastrointestinal, reduciendo la carga bacteriana total, asociada con la disminución de competencia entre bacterias por nutrientes (Dibner et al, 2002). Además, favorecería la absorción de nutrientes por adelgazamiento de la mucosa gastrointestinal, reduciría la producción de toxinas por bacterias intestinales y disminuiría microorganismos causantes de infecciones subclínicas (Allen et al, 2013; Butaye, et al., 2003; Feighner, 1987).

A pesar de los beneficios reportados, el uso de antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias para producción animal puede seleccionar y promover la aparición y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos (Davies et al, 2006). Las bacterias expuestas por tiempos prolongados a dichos antimicrobianos pueden usar diferentes vías para escapar a su acción letal, como disminuir su acumulación intracelular, por alteración de la permeabilidad de la membrana,

disminuyendo el transporte a través de ésta o el eflujo activo. Otra forma implica la alteración del sitio de acción del antimicrobiano por mutaciones o modificaciones enzimáticas. La expresión de estos mecanismos de resistencia implican costo energético a la bacteria, por lo que hay mecanismos que regulan su expresión, lo que refleja un compromiso entre el ahorro de energía y la adaptación a un entorno en rápida evolución (Depardieu, *et al.*, 2007). La modulación de la expresión de genes puede ocurrir a nivel transcripcional o translacional, y está dada por mutaciones o la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles que depende o puede ser inducida por presión antibiótica en el medio (Courvalin, 2008a; Depardieu, *et al.*, 2007; Engelstädter, 2016)

Las bacterias resistentes viven junto con otras bacterias en ecosistemas complejos como intestino, piel, mucosa o ambientes naturales. En éstos están en contacto continuo con billones de miembros pertenecientes a miles de especies diferentes, que comparten información genética por transferencia horizontal de elementos genéticos móviles. Estos son portadores de determinantes de resistencia que pueden ser movilizados a bacterias que residen en el mismo nicho a través de eventos de transferencia horizontal de genes mediados por procesos de conjugación, transformación y/o transducción. La selección de estos determinantes de resistencia depende de factores como penetración, promiscuidad, plasticidad y persistencia (González *et al.*, 2016)

Así la resistencia a antimicrobianos es un problema multifactorial, y la aparición de bacterias resistentes a antibióticos utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas es un problema insignificante comparado con el impacto de la diseminación de bacterias resistentes en el ambiente. Una de la principales fuentes de resistencia a antimicrobianos reportada es el uso de antimicrobianos en producción animal, que ha llevado a la aparición de clones resistentes a antimicrobianos identificados tanto en animales como humanos (Benito, *et al.*, 2015; Ibekwe, *et al.*, 2011; Marshall *et al.*, 2011). La transmisión de bacterias resistentes se puede dar de animales a humanos por contacto directo, a través de alimentos de origen animal contaminados con bacterias de la microbiota resistentes a antimicrobianos, selección y movilización de bacterias resistentes y genes de resistencia por uso de agua de vertientes con alta presión antibiótica, riego de cultivos con aguas residuales y uso de materia fecal como abono o compost (Hong *et al.*, 2013; Walsh, Thanner *et al.*, 2016), todas éstas prácticas detectadas en la granja. Otro aspecto que favorece que

permanezca la resistencia es la liberación de antimicrobianos al ambiente desde hospitales, la comunidad y los sistemas de producción animal ([Cantón, et al., 2013](#); [Tello, et al., 2012](#)).

## **Modelo de resistencia**

En Colombia, la inspección, vigilancia y control en los sistemas de producción animal son el ICA, encargado de la vigilancia de las condiciones sanitarias e inocuidad en la producción primaria de ganado porcino, destinado al sacrificio para consumo humano ([Resolución 2640, 2007](#)), el INVIMA que vigila plantas de beneficio y distribución de productos cárnicos a puntos de venta, y secretarías de salud encargadas de vigilar la inocuidad de los productos para consumo humano.

Analizando las resoluciones de estos entes de control, la información recopilada en la encuesta, la entrevista y lo observado en las visitas para recolección de muestras se puede afirmar que en la granja en estudio se cumplen los requisitos de instalaciones y áreas exigidos en la resolución 2640 del 2007 del ICA. Se identifican 5 áreas divididas por módulos y corrales necesarios para evitar el confinamiento de animales. Las áreas están distribuidas según la etapa productiva de los animales y se llevan registros de temperatura y humedad en cada área. Como no realizan prácticas de inseminación artificial, no requieren de un laboratorio para tal fin. En cuanto al almacenamiento de insumos pecuarios como alimentos y medicamentos cuentan con áreas cerradas, separadas y debidamente identificadas. Además llevan un control de inventarios del número de medicamentos y alimentos que manejan. Cuentan con médico veterinario de tiempo completo, que asegura la sanidad animal y prescribe antibióticos cuando son requeridos para profilaxis y tratamiento.

Con respecto a normas de bioseguridad la granja también cumple con las medidas exigidas. Hace manejo de registros de entrada y salida de personas, animales y vehículos. Practica protocolos de limpieza y desinfección de las áreas, instalaciones y equipos. Para desinfección aplican inmersión de botas antes de entrar a cada una de las áreas, y lavado de módulos y corrales. Los residuos líquidos y sólidos de los corrales, son eliminados al campo por dispersión de agua.

Esto último, no obstante, es un foco potencial de diseminación de bacterias resistentes. Los residuos descargados contienen orina, heces, y restos de antibióticos, algunos de los cuales no son metabolizados completamente, y pueden generar

presión antibiótica, favoreciendo selección de bacterias resistentes y/o transferencia de determinantes de resistencia entre bacterias de los residuos eliminados al campo y las ambientales. Más aún, su uso como abono, en la granja y su venta a nivel local aumentan el área de impacto que podrían tener.

Un estudio donde se caracterizó la presión selectiva ejercida por la contaminación con antibióticos en bacterias de importancia en salud pública, mostró aumento de la prevalencia de bacterias resistentes (Tello, *et al.*, 2012). Identificaron restos de ciprofloxacina, eritromicina y tetraciclina en sedimentos de ríos, heces de cerdos, materia fecal líquida y suelos de granjas, sugiriendo que estos ambientes son puntos críticos de selección de resistencia. Además mostraron que la exposición crónica a antibióticos favorece transiciones de resistencia de bajo a alto nivel (Tello, *et al.*, 2012). Otros estudios indican también que el uso de tetraciclinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas, selecciona los genes de resistencia *Tet(S)*, *qnr(S)*, *Sul1-2* y *oqxA-B* y *aac(6')-IB* (Xiong, *et al.*, 2015).

Así a partir de fuentes ambientales pueden diseminarse bacterias y/o genes de resistencia con las implicaciones de esto en la salud de consumidores de alimentos contaminados (leche y carne), que puede incrementar costos de hospitalización y complejiza el manejo de infecciones por microorganismos resistentes. Por tanto, el conocimiento de los patrones de uso de antibióticos, la búsqueda de bacterias antibiótico-resistentes y el establecimiento de relaciones causales (genes involucrados), es fundamental para entender y mejorar prácticas agrícolas. Además el conocimiento de cómo estos medicamentos son utilizados indica sobre la magnitud del riesgo y la necesidad de introducir otros métodos de control (Redding, *et al.*, 2014). Esta información es importante para diseñar, implementar y evaluar intervenciones regionales y locales dirigidas a optimizar el uso de medicamentos veterinarios y mejorar las prácticas de producción.

La evidencia generada de la granja analizada en cuanto al uso de antibióticos, identifica un vacío en el conocimiento de las personas vinculadas como trabajadores sobre su uso, asociación con resistencia antimicrobiana e impacto ambiental. Así se identifica la necesidad de instruir a este grupo y de hacer campañas educativas en los sistemas de producción y en la comunidad para sensibilizar sobre esta problemática.

Si bien se reportó administración de antibióticos para tratamiento y profilaxis, no se considera ésta como promoción de crecimiento, aunque se podría argumentar que durante el destete este sería su propósito. Todas las resistencias encontradas en

las muestras analizadas se pueden asociar directamente con antibióticos o desinfectantes usados en la granja, apoyando la hipótesis de este trabajo, excepto la detectada fenotípica y genéticamente para colistin. Analizando la información proveída se exploró la información de las premezclas. Dentro de éstas, hay una recomendada por el proveedor para prevenir diarreas, denominada aurolistina que contiene sulfato de colistin. Este medicamento cuenta con registro del ICA, y está por tanto autorizado sin restricción. Más preocupante aún, al ser parte de una pre mezcla no requiere prescripción médica. Este punto muestra un vacío en la legislación en el sector pecuario, con consecuencias serias en salud animal y humana porque este antibiótico particular es fármaco de última línea para el tratamiento de infecciones de difícil manejo (Catry et al., 2015).

Los grupos de antibióticos más utilizados en la granja son  $\beta$ -lactámicos (amoxicilina, penicilina, cefalosporinas de tercera generación), quinolonas (enrofloxacina y ciprofloxacina), macrólidos (tilosina), tetraciclinas (oxytetraciclina) y sulfanilamidas negasunt). Algunos de estos antibióticos se han reportado como contaminantes ambientales que aumentan la prevalencia de bacterias resistentes [Figura 20.](#)(Tello, et al., 2012). Para desinfección de corrales utilizan amonio cuaternario, antimicrobiano de amplio espectro y reportado como fuente de co-selección de genes de resistencia presentes en integrones (Carson et al, 2008; Engelstädter, et al., 2016).

Por análisis estadístico se evaluó la asociación entre el uso de antimicrobianos en los aislamientos de *E. coli* resistente a múltiples antimicrobianos utilizando los modelos de regresión logística y Poisson. Los resultados de este análisis proporcionan evidencia sobre la relación entre el uso de antibióticos y la resistencia a antimicrobianos en la granja en estudio. Datos relacionados a lo reportado por (Varga et al., 2009), quienes identifican que el uso de antimicrobianos en granjas porcícolas está asociado con el aumento de resistencia. En nuestro estudio este efecto se evidencia especialmente en las áreas de pre-ceba, ceba y partos, donde identificamos el mayor uso de antimicrobianos para profilaxis. Lo que sugiere que el uso de antimicrobianos en dosis subterapéuticas por determinados periodos de tiempo es un factor de riesgo para desarrollar resistencia. En la granja en estudio sólo fue posible determinar un efecto significativo entre el uso de quinolonas, resistencia antimicrobiana y la presencia de los genes plasmídicos *qnrB19*, hallazgos de importancia epidemiológica ya que este gen ha sido previamente reportado en el país, en aislamientos de *Salmonella spp* de diferentes serovares recuperados de una

variedad de productos alimenticios y animales, en diferentes áreas como: Cartagena, Montería y Barranquilla (Karczmarczyk et al 2010). Este es el primer reporte de esta variante del gen en Cundinamarca, lo que nos lleva a sugerir la amplia diseminación de estos genes en el país y la necesidad de tomar medidas de contención en el uso de antibióticos en los sistemas de producción animal y la necesidad de analizar otros sistemas de producción para caracterizar esta problemática.

En cuanto a la asociación entre el uso de otros antibióticos y la resistencia identificada en nuestro estudio, no se hallaron efectos estadísticamente significativos, a diferencia de los resultados reportados en otros estudios donde identifican una relación directa entre el uso de ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, trimetoprim sulfametoxazol y tetraciclina con la resistencia a antimicrobianos detectada en las 269 granjas analizadas (Varga et al., 2009), es importante resaltar que la mayoría de las granjas analizadas en este estudio no son de ciclo completo, es decir no van desde la fecundación hasta la venta de animales a la planta de beneficio, sino son granjas especializadas en la producción de animales grandes, donde más se utilizan antibióticos para profilaxis y tratamiento, lo que nos lleva a sugerir que estas diferencias encontradas posiblemente están relacionadas con el número de granjas y el tipo de área muestreadas.

En 7 de los aislamientos resistentes a quinolonas con MIC >4 mg/mL se identificaron mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* pero no fue posible determinar una relación estadísticamente significativa con el uso de quinolonas en pre-ceba y estas mutaciones posiblemente por el bajo número de muestras con estas características.

El uso de antibióticos en las áreas de pre-ceba, ceba y partos está relacionada con la presencia de los genes *bla<sub>TEM</sub>*, no fue posible establecer esta relación con un antibiótico específico, lo que nos lleva a sugerir que la amplia diseminación de este gen en la granja puede estar relacionada con el uso de múltiples antibióticos que puede seleccionar o co-seleccionar el gen detectado. Además en otros estudios se ha demostrado que el grado de resistencia a antibióticos está más asociado con la etapa de producción es decir el área que con la granja completa, datos concordantes a lo encontrado en nuestro estudio donde encontramos un efecto altamente significativo ( $p=0.000121$ ) entre la resistencia y las áreas de pre-ceba, ceba y partos donde se reporta un mayor uso de antimicrobianos (Boerlin et al., 2005; Dewulf et al., 2007; Varga et al., 2009).

Con respecto al análisis de la relación entre la resistencia a antimicrobianos y la presencia de otros genes de resistencia encontramos un efecto altamente significativo ( $p=0,00591$ ) con los genes *qacΔ*, este gen fue identificado principalmente en el área de pre-ceba, lo que nos lleva a sugerir que puede ser co-seleccionado por el amplio uso de antimicrobianos en el área, también es importante resaltar que en la granja en estudio es utilizado amonio cuaternario como desinfectante al que confiere resistencia este gen, lo que llama la atención es que solo se haya identificado en 15/104 aislamientos específicamente en el área de pre-ceba y no en toda la granja donde se utiliza el desinfectante. No se encontró un efecto significativo entre el uso de sulfonamidas reportado y la presencia de los genes *Int1-3*, *sul1*, *sul2* y *qacΔ*. Diferentes estudios realizados han demostrado una asociación entre amplio uso de antimicrobianos, la multirresistencia y la aparición y diseminación de estos genes en granjas de producción animal y ambiente (Farkas et al., 2016; J.-T. Hsu et al., 2014), lo que sugiere que estos genes se movilizan y diseminan en la granja por co-selección.

### Modelo de resistencia a antibióticos en la granja en estudio



Figure 28. Modelo de resistencia a antibióticos en la granja en estudio.

Se recuperaron las bacterias indicadoras de la microbiota intestinal de animales y humanos *E. coli*, *E. faecium* y *E. faecalis*, y el patógeno *S. aureus*, de importancia epidemiológica por movilización de clones de animales a humanos (Benito *et al.*, 2015; Pantosti, 2012). No se recuperó *Salmonella spp* de las muestras analizadas a pesar de utilizar protocolos optimizados, que permitieron reportar prevalencia de 27% de *Salmonella spp* en carne de pollo (Donado-Godoy, *et al.*, 2012). Podría sugerirse que esto se debe a las bajas prevalencias (1-7,8%) reportadas (Rasschaert, *et al.*, 2012) y su dependencia con la etapa productiva y el tipo de granja. También que las medidas de bioseguridad implementadas en la granja eliminan la presencia de *Salmonella spp* o que el protocolo de recuperación no está ajustado para las muestras recolectadas.

*S. aureus* se identificó sólo en 2% de las muestras analizadas, lo que lleva a indagar si la metodología utilizada para su recuperación fue la adecuada. Linhares, *et al.*, 2015 recomiendan introducir un hisopo de 2-7 cm profundidad en ambas fosas nasales y girarlo contra la mucosa del epitelio. Si bien en este estudio se trató de seguir esta recomendación pero uno de los inconvenientes identificados en el momento de la toma de muestras fue tamaño de los animales y su difícil manejo. La baja prevalencia encontrada, otros estudios han reportado prevalencias de 32-91% (Benito *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2015), puede ser por subestimación debido a la competencia en animales que están en contacto permanente con microbiota gastrointestinal. Este microorganismo se ha encontrado en la microbiota de animales y humanos como colonizante de piel y mucosas, y es la segunda causa de infecciones asociadas a la atención en salud en Bogotá (SDS, 2014). Los complejos clónales CC5, CC2, CC30 o CC45 han sido asociados con ambientes hospitalarios (Benito *et al.*, 2016). Sin embargo, en los últimos años otros linajes genéticos han emergido; entre ellos CC398, CC1, CC9, CC130 o C133 resistentes a metilicina, identificados en animales y humanos, y considerados problema zoonótico, lo que señala la importancia de caracterizar los linajes genéticos circulantes en los sistemas de producción animal (Benito *et al.*, 2016).

De las cepas recuperadas se seleccionó un representante del clon identificado el cuál se analizó por secuenciación. Éste pertenece a ST9, parte del complejo clonal CC9, previamente reportado en aislamientos de *S. aureus* metilicina resistente y recuperado de animales y trabajadores en Asia (Ye *et al.*, 2016). Este grupo clonal se ha asociado con el plásmido pUSA02, identificado por la presencia de genes *rep 7* (Malachowa *et al.*, 2010). Datos concordantes con los hallazgos en la cepa en estudio, donde aparecen genes *rep7* asociados con genes de resistencia a tetraciclina (*tet(K)*),

en plásmidos pKH1. Además de estos genes se presentan los genes *rep10b*, relacionados con el plásmido críptico<sup>18</sup> pSK6 y los genes *Vga(A)* y *blaZ*, reportados en plásmidos y que confieren resistencia a clindamicina y penicilina respectivamente.

Estos hallazgos son de importancia epidemiológica por la exitosa diseminación reportada de este complejo clonal de animales a humanos (Ye *et al.*, 2016); además por ser portadores de plásmidos de resistencia que favorecen la diseminación de estos elementos genéticos por transferencia horizontal a otras especies bacterianas y su permanencia por presión antibiótica. La presión ejercida en la granja que favorece la conservación de estos genes en la cepa de *S. aureus* analizada, puede estar asociada con el amplio uso de medicamentos en el área de gestantes, donde se recuperaron las muestras, entre los cuales se reportaron oxytetraciclina, tilosina y amoxicilina para el tratamiento de mastitis, problemas respiratorios y problemas uterinos. Estos antibióticos pueden seleccionar los genes *tet(K)*, *Vga(A)* y *bla Z* respectivamente.

La recuperación de 32% de *E. faecalis* y el 15% *E. faecium* en las muestras analizadas, es comparable con lo reportado en la literatura, donde han identificado *Enterococcus spp* en 43% de las muestras analizadas (Liu, *et al.*, 2013). *E. faecium* se identificó en el área de gestantes, con perfiles de multirresistencia a tetraciclinas (minociclina, tetraciclina), estreptograminas (quinupristin), aminoglicósidos de alta carga (estreptomina) y macrólidos (eritromicina).

Uno de los aislamientos enviados a secuenciación como *E. faecalis*, se identificó como *E. faecium*, mostrando limitaciones de los equipos automatizados para la taxonomía de *Enterococcus spp* y la necesidad de corroborar con otra metodología género y especie. Se clasificó en el linaje genético ST16, identificado en cerdos, aves, humanos sanos y pacientes (Freitas *et al.*, 2009). Éste además se ha asociado a cepas con altos niveles de resistencia a aminoglicósidos, tetraciclinas, y macrólidos información concordante con lo identificado en este estudio.

En el aislamiento analizado por secuenciación encontramos los genes *rep1*, *rep9*, *rep22-repUS12*, relacionados con los plásmidos *pGB354* (asociado con

---

<sup>18</sup> Plásmidos sin función conocida, no le proporciona ventajas al hospedero

resistencia a cloranfenicol), y *pAD1*, *pUB110* (aminoglicósidos) (Clewell et al., 2014; Jensen et al., 2010; Lozano et al., 2012). En otros estudios, han reportado la resistencia a tetraciclinas asociada con la presencia de los genes *tet(M)*, *tet(O)* y *tet(S)* que codifican para proteínas de protección ribosomal, localizados en plásmidos conjugativos, transposones (Tn916) y a nivel cromosomal (Frye & Jackson, 2013). En la cepa en estudio se identifica el gen *tet(L)*, asociado con sobre expresión de bombas de eflujo a nivel plasmídico, y de importancia clínica ya que confiere resistencia a tigeciclina principal opción terapéutica para infecciones asociadas a la atención en salud por *S. aureus* meticilino resistente y *Enterococcus spp* resistentes a glicopéptidos (Hollenbeck & Rice, 2012). En el caso de las estreptograminas y macrólidos el mecanismo de resistencia más frecuente es la modificación del sitio de unión del antibiótico, mediada por los genes *erm(B)*, la sobre expresión de bombas de eflujo codificada por el gen *msrC*, y la producción de enzimas que inactivan el antibiótico conferida por el gen *Inu(B)*, descrito hasta el momento en cepas de mascotas (Frye et al, 2013). Estos datos corresponden bien con lo identificado en este estudio, donde los genes *erm(B)*, *erm(A)*, *inu(B)*, fueron identificados en *E. faecium* de cerdas gestantes, lo que indica su diseminación a otros animales y el gen *Isa(A)* responsable de sobre expresión de bombas de eflujo; estos genes se han identificado a nivel cromosomal y plasmídico tanto en *S. aureus* como en *E. faecium* y *E. faecalis*, sugiriendo transferencia de información genética entre estos microorganismos bajo presión antibiótica constante.

La resistencia a aminoglicósidos se ha asociado a la acción de enzimas acetiltransferasas, adeniltransferasas o fosfotransferasas que modifican el antimicrobiano, y codificadas en los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (Frye et al, 2013). Por secuenciación se encontraron los genes *aph(3')-III*, *aac(6')-aph(2')*, *ant(6)-Ia*, junto con el gen para la enzima dehidrofolato reductasa, responsable de resistencia a trimetropin y los genes *optrA*, *fexA* y *cat*, asociados con resistencia a fenicoles (cloranfenicol, florfenicol) y oxazolidionas (linezolid). A nivel cromosomal hay mutaciones en los genes para las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV que confieren niveles de resistencia a quinolonas altos.

La presión antibiótica ejercida en estos microorganismo fue la misma que la descrita en *S. aureus*, por esta razón los perfiles de resistencia son similares a pesar de ser microorganismos de diferente género y especie. La mayoría de estos genes se han identificado a nivel plasmídico (Malachowa et al 2010), lo que sugiere

transferencia y movilización de genes de resistencia entre diferentes bacterias en la granja en estudio promovida por la presión antibiótica impuesta.

*Escherichia coli* se recuperó en el 97% (n=104) de las muestras analizadas, este ha sido uno de los microorganismos más estudiados para el análisis de resistencia a antibióticos, para secuenciación se seleccionaron tres aislamientos con altos niveles de resistencia a diferentes clases de antimicrobianos, dos de estos analizados en este estudio identificados como 1-16; y el otro analizado por [Rubio, 2016](#), identificado como 96, en este último se identificaron los genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y Colistin: *bla* *CMY-2* y *MCR-1*, respectivamente.

Los datos de secuenciación muestran que la cepa 1 pertenece al ST 746, previamente reportado en un paciente de Dinamarca portador del gen OXA-48 sin historia de hospitalización, concluyendo que la adquisición de este microorganismo productor de carbapenemasas está posiblemente asociada a la ingestión de alimentos contaminados ([Gedebjerg et al, 2015](#)). La cepa 16 al ST617, previamente reportado en Nigeria en aislamientos de pacientes de un hospital universitario y en la microbiota gastrointestinal de animales de compañía y animales de granja en México y Tanzania, portadores del gen *bla* *CTX M-15*, también identificado en la cepa en estudio ([Aibinu et al, 2012](#); [Rocha-Gracia et al., 2015](#); [Seni et al., 2016](#)), mostrando una vez más el potencial riesgo en salud pública de la selección y persistencia de estos grupos genéticos y la importancia de contener esta problemática para evitar la diseminación de estos microorganismos entre animales, ambiente y humanos.

Las cepa #1 y 96 presentaron resistencia en común a: ampicilina, ampicilina sulbactam, cefalosporinas de segunda y tercera generación, ciprofloxacina y trimetoprim, la cepa 1 además es resistente a colistina, levofloxacina y tigeciclina, la cepa 16 a: cefalosporinas de cuarta generación y gentamicina. Estas cepas fueron recuperadas del área de pre-ceba, una de las áreas con mayor uso de antibióticos, entre ellos: Ceftiofur (cefalosporina de tercera generación), Cefexim (ciprofloxacina), Enrover (Enrofloxacin) en caso de infecciones gastrointestinales y Oxytetraciclina, Tilosina (macrólido) y Veterflucina (penicilina, estreptomicina y flumetasona) para problemas respiratorios. Se identifica una relación entre los antibióticos utilizados y la resistencia encontrada.

En estos aislamientos se identificaron por PCR los genes: *bla* *TEM*, *Int1-3*, en común, además en la cepa 1 se identificaron los genes *qnrB*, *MCR-1*, *qacEA1* y los

grupos de incompatibilidad: *HI1* y *N*. En la cepa 16 identificamos los genes: *bla CTX-M*, *Sul2* y los grupos de incompatibilidad *I1* y *FIB*.

Por secuenciación en la cepa 1 se confirmó uno (*IncN*) de los cuatro grupos de incompatibilidad detectados: *IncHI2A*, *IncN*, *IncX1*, *IncHI2*, además se identificó el plásmido *p0111* y en la cepa 16 se corroboraron dos (*IncI1- IncFIB*) de los de los tres grupos identificados: *IncI1*, *IncFIB*, *IncX1*. En el análisis de la relación entre los antibióticos más utilizados, los genes confirmado y los plásmidos asociados se encontró:

El uso de ceftiofur puede seleccionar y promover resistencia a  $\beta$ -lactámicos mediada por los genes *bla TEM-1B* y *bla CTX M-15* confirmados por secuenciación e identificados el primero en las dos cepas analizadas y el segundo en la cepa 16. Estos genes se han reportado en plásmidos con grupos de incompatibilidad, *FIIA*, *FIA*, *FIB*, *I1*, *IncI1*, *IncFIB* (Zhang et al, 2013), de los cuales el *FIB* y *I1* se encontraron en las cepas en estudio, lo que sugiere la presencia de esos genes en los grupos identificados.

El uso de Enrofloxacin y Ciprofloxacina, agentes antimicrobianos de amplio espectro, eficaces para el tratamiento de infecciones por bacterias gram positivas y gram negativas, la resistencia a estos agentes es multifactorial, puede ser por mutaciones en el sitio de acción del antibiótico (*gyrA* y/o *parC*), sobreexpresión de bombas de eflujo y/o cambios en la permeabilidad. (Redgrave et al, 2014). la resistencia cromosomal se ha relacionado con valores de CMI  $\geq 4$  y la plasmídica  $\leq 2$  (Cercenado et al, 2008), datos concordantes a los identificados en este estudio, en la cepa 16 con CMI  $\geq 4$ , encontramos mutaciones en los genes *gyrA* y *ParC*, en contraste en la cepa 1 con CMI de  $\leq 2$ , identificamos el gen *qnrB* reportado a nivel plasmídico. Estos plásmidos se han asociado con los grupo de incompatibilidad *IncN* (Carattoli, 2013) identificados en la cepa 1.

El uso de Oxitretaciclinas está asociado con los genes *tet (A)* y *tet (M)* identificados en la cepa 1 y 16, en gram negativos estos genes se han identificado en grupos de incompatibilidad *FIA* y *FIIA*, no identificados en las cepa en estudio, lo que sugiere la presencia de estos genes en otras plataformas móviles como secuencias de inserción y/o transposones. Además se identificó la *Integrasa 1-3* y los genes *drfa12*, en las dos cepas en estudio, y lo genes *sul 2* y *3* en el cepa 16, lo que indica la presencia de integrones, plataformas dinámicas que albergan diferentes genes de resistencia en cassette que explicarían las otras resistencia identificadas.

Por último, encontramos altos niveles de resistencia a Colistin, antibiótico no reportado para tratamiento o profilaxis, pero identificado en una de las premezclas utilizadas en la granja en estudio, la resistencia a este antimicrobiano se ha asociado con mutaciones cromosomales en los genes *pmrB* y *pmrA* modificando el sitio de acción del medicamento. [Liu et al., 2015](#) identificaron los primeros aislamientos de *E. coli* con genes de resistencia a colistin codificados a nivel plasmídico. La MCR-1 es miembro de la familia de enzimas fosfoetanolamino transferasas, adicionan una fosfoetanolamina al lípido A impidiendo la unión del antimicrobiano. [Arcilla et al, 2016](#) identificaron dos aislamientos resistentes a colistina en *E. coli* portadores del gen *MCR-1*, recuperada de un cerdo y un humano indistinguibles genéticamente por electroforesis en campo pulsado, sugiriendo la transmisión de animal a humano de la misma cepa, un estudio multicéntrico de vigilancia de resistencia antimicrobiana realizado en Brasil evaluó la resistencia a colistin en 4620 muestras de enterobacterias recuperadas de diferentes fuentes: humanos, animales, alimentos y ambiente recolectadas del 2000 al 2016, identificaron el gen MCR-1 en muestras recolectadas en algunas ciudades de Brasil, reportándolo por primera vez en Latinoamérica y en aislamiento recuperados desde el 2012 ([Fernandes et al, 2016](#)). La diseminación de este gen se ha convertido en un tema controversial por el impacto en salud pública que genera. A la fecha, hay una serie de reportes a nivel mundial sobre este gen en diferentes especies de Enterobacterias recuperadas de muestras de animales, humanos y alimentos ([Bai et al., 2016](#); [Khalifa et al., 2016](#); [Liassine et al., 2016](#); [Malhotra-Kumar et al., 2016](#); [Poirel, Kieffer, Liassine, Thanh, & Nordmann, 2016](#); [Quesada et al., 2016](#); [Shen, Wang, Shen, Shen, & Wu, 2016](#); [Zeng, Doi, Patil, Huang, & Tian, 2016](#)). En Colombia el gen MCR-1 se ha identificado en 3 aislamientos de *Salmonella typhimurium* recuperados en Antioquia, Bogotá y Boyacá y un aislamiento de *E. coli* en una paciente de Santander ([Saavedra, Arévalo, Ovalle, Montaña, & Hidalgo, 2016](#))

En este estudio se identificaron 86/104 cepas de *E. coli* resistentes a colistin, en 97% (n=84) se identificó el gen MCR-1 (100% identidad) en *E. coli* recuperada de las muestras de animales y ambiente en la granja en estudio. Siendo el primer reporte de la presencia del gen en el país, estos resultados permiten sugerir que la alta frecuencia identificada está asociada con el uso de premezclas con antimicrobianos (colistina) en la granja en estudio, mostrando la necesidad de tomar medidas de contención para evitar la diseminación de este gen a la comunidad y posterior ambiente hospitalario.

Es importante resaltar que la mayoría de genes identificados se encuentran localizados a nivel plasmídico y en otras plataformas genéticas que se mantienen por la presión selectiva generada por el constante uso de antibióticos en la granja en estudio, sugiriendo la alta movilización de estos genes en la granja y a necesidad de tomar medidas preventivas para evitar que estos sean diseminados a la comunidad

### **Vigilancia y Contención de Resistencia a antimicrobianos en sistemas de producción animal.**

En Colombia, diferentes estudios demostraron que la resistencia a antimicrobianos es muy alta en bacterias zoonóticas aisladas de las cadenas avícola y porcícola, presentando niveles de resistencia de 96% para tetraciclina, 74% para ceftiofur y 85% para ciprofloxacina ([Donado-Godoy et al., 2012, 2015](#)), siendo muy superior a lo reportado en otros países ([EFSA, 2013](#); [Zaidi et al., 2012](#), [DANMAP, 2014](#)). De estos antibióticos, ceftiofur y ciprofloxacina deberían ser usados únicamente en humanos, pero en Colombia el criterio de antibióticos de uso crítico todavía no está incorporado en las regulaciones, y se conoce poco sobre su uso en producción animal. No hay datos tampoco sobre la magnitud del problema debido a que no existen mecanismos que determinen qué cantidades y clases de antibióticos se usan y cuál es su impacto en el desarrollo de resistencia a antimicrobianos tanto en humanos como en sistemas de producción agrícola y pecuaria. Para contener la resistencia es fundamental la vigilancia integrada de la misma asociada al uso de antibióticos, en la parte humana, de alimentos y animal.

Para minimizar la resistencia antimicrobiana detectada se propone tomar la granja analizada como modelo de vigilancia y contención, iniciando la educación de trabajadores, familiares y habitantes de la vereda sobre uso prudente de antibióticos, resistencia a antimicrobianos, riesgos y alternativas de solución. Entre éstas se puede mejorar la disposición de residuos, disminuir la administración de antimicrobianos, implementar otras medidas de control y profilaxis como los probióticos, prebióticos y simbióticos para selección de flora benéfica ([Jurado et al., 2009](#); [Martinez et al., 2012](#); [Rodriguez et al., 2005](#)) y el uso de fagos como alternativa de tratamiento ([Cheng et al., 2014](#); [Holguín et al., 2015](#)).

Basados en los resultados obtenidos en este estudio, se presentó un proyecto macro al sistema nacional de regalías que propone la reactivación del sistema integrado de vigilancia de resistencia antimicrobianos sugerido por [Donado-Godoy, et](#)

[al., 2015](#) y su aplicación a toda la cadena productiva en los principales sistemas de producción animal (aves, cerdos, vacas y peces), con el fin de evaluar el riesgo al que están expuestos animales, trabajadores, ambiente y comunidad.

## **Conclusiones y recomendaciones**

Se identificaron como puntos críticos de contaminación los corrales donde los animales están expuestos a un mayor número de antimicrobianos, por los residuos de antibióticos y bacterias resistentes presentes, y el ambiente a donde son eliminados los residuos de los corrales, exponiendo a bacterias ambientales a los antibióticos eliminados por excretas, lo que favorecería la adquisición de determinantes de resistencia que pueden diseminarse en la comunidad.

Los datos sugieren que hay diseminación de cepas entre áreas, que puede explicarse por contacto directo e indirecto y presión antibiótica que favorece que algunos tipos de cepas se mantengan y diseminen

Los genes identificados se encuentran localizados a nivel plasmídico y en otras plataformas genéticas que se mantienen por la presión selectiva generada por el constante uso de antibióticos en la granja en estudio, sugiriendo la alta movilización de estos genes en la granja y la necesidad de tomar medidas preventivas para evitar que estos sean diseminados a la comunidad

Los datos de secuenciación confirman la presencia de los genes identificados por PCR, apoyando en forma contundente con la hipótesis inicial de este trabajo que proponía que el uso de antibióticos, induce presión selectiva que promueve la aparición y mantenimiento de resistencia a antimicrobianos.

## **Recomendaciones**

- Evaluar el impacto del uso de antimicrobianos en otras cadenas productivas
- Implementar un sistema de vigilancia integrado
- Evaluar el riesgo al que están expuestos los trabajadores en los principales sistemas de producción
- Proponer estrategias alternativas al uso de antimicrobianos para tratamiento y profilaxis

- Concientizar a los diferentes sectores (animales, humanos y ambiente) sobre la importancia del uso prudente de antimicrobianos

## **Tesis**

Este estudio mostró que el uso de antimicrobianos en la granja analizada promueve la selección de bacterias resistentes, la transferencia horizontal de genes de resistencia por la movilización de elementos extracromosomales, manteniendo estas características de resistencia y favoreciendo la aparición de nuevas variantes por el proceso natural de evolución bacteriana

## Anexos

### Anexo A. Encuesta 1: Cuestionario de Muestreo en Granja <sup>19</sup>

#### 1. General:

- Fecha de la visita
- Empresa
- ID de la granja
- Municipio
- Vereda
- Altura de la granja (msnm)
- Raza de los cerdos
- Nivel de bioseguridad clasificada por la empresa (1-5)

#### 2. Información de la muestra:

##### Muestra 1

##### Unidad de Producción 1:

- Corral #
  - Sexo
  - Dimensiones del corral
    - Ancho
    - Largo
  - # de cerdos en el corral
  - Edad en el ciclo de producción
  - Mortalidad acumulada
  - Tipo de muestra:
  - ID de la muestra:
- 

<sup>19</sup> Encuesta proporcionada por el grupo de resistencia antimicrobiana de Corpoica

**3. Información de la granja**

- Número de cerdos en la granja
- Número de corrales en la granja
- Origen de los cerdos:

**4. Operaciones Mixtas**

**Identificar una especie animal adicional en la granja**

Tipo de animal	Nº de animales	Alojamiento por separado (si/no)
Bovinos de leche		
Bovinos de carne		
Terneros		
Pavos		
Ovejas		
Caballos		
Gatos		
Perros		
Otro		

## 5. Manejo

- ¿Qué tipo de alimento consumen los cerdos?
- ¿Cuál es el tipo de piso?
  - Concreto
  - Tierra
  - Otro
- Los corrales tienen división de paredes (si/no)
  - Qué tipo de división
- Se tiene desagüe?
  - Desagüe en los campos
  - Otro

## 6. Información del agua de la granja

- Tipo de fuentes de agua para beber en la granja
- Pozo profundo                      Profundidad
- Lago artificial
- Acueducto
- Otro

Se realiza desinfección del agua de la granja

(si/no):

Si contestó sí ¿Cuál es el tipo?

- Ultra violeta (UV)
- Cloro
- Peróxido
- Otra

Tipo de fuente de agua para beber en la casa (si es diferente que el agua de la granja)

- Pozo profundo                      Profundidad

- Lago artificial
- Acueducto
- Otro

Se realiza desinfección del agua de la casa (si/no)

Si contestó sí, ¿Cuál es el tipo?

- Ultravioleta
- Osmosis inversa (OI)
- Combinación UV/OI
- Cloro
- Destilación
- Filtro BRITA tap
- Filtro de Jarra
- Refrigerador
- Otro

#### **7. Desinfectantes usados para instalaciones y equipo**

- Fenoles
- Cresoles
- Bisfenoles
- Hipocloritos
- Yodados
- Formaldehído
- Amonio cuaternario
- Glutaraldehído
- Peróxido de hidrogeno
- 2-fenoxietanol
- Sulfato de cobre

- Agua caliente
- Calor seco

## 8. Uso de antibióticos

Tipo de Antibióticos	Sí	No
Promotores de crecimiento Halquinol Virginamicina Otro		
Antimicoplásmicos Tartrato de tylosina Fosfato de tilmicosina Fumarato hidrogenado de tiamulina Lincomicina Espiramicina Donafloxacina Clortetraciclina+tiamulina		
Antibióticos de amplio espectro Fosfomicina cálcica Florfenicol Ceftiofur sódico		

Oxitetraciclina		
Oxitetraciclina +Neomicina		
Gentamicina		
Tetraciclina		
Clortetraciclina		
Amoxicilina		
Bacitracina		
Eritromicina		
Cefalosporinas		
Trimetoprim		
Quinolonas:		
Enrofloxacina		
Ciprofloxacina		
Norfloxacina		
Danofloxacina		
Antimicóticos		
Enilconazol		

**Observaciones:**



## Anexo B. Encuesta 2: Uso de antimicrobianos

### Información básica de la Granja

1. Número de personas trabajando en la granja:      Hombres      Mujeres
2.      ¿Pertenece a una asociación de productores?      Sí      No
3.      ¿Cuánto animales tiene?

#### Antibióticos/ tratamiento

4.      ¿Ha administrado antibióticos a sus animales?  
Sí      No
5.      ¿Cuáles?
  
6.      ¿Sabe qué es un antibiótico?      Sí      No  
Si lo sabe, defina qué es un antibiótico
  
7.      ¿Sabe qué es resistencia a antibióticos?      Sí      No  
Si lo sabe, defina qué es resistencia a antibióticos
  
8.      Dónde compra los antibióticos de uso en la granja
  
9.      Cuántos episodios de los descritos a continuación ocurren aproximadamente al año

	# episodios sin tratamiento	# de episodios con tratamiento	Medicamentos utilizados
Mastitis			
Enfermedades después del parto			
Enfermedades respiratorias			
Diarrea			
Infecciones de piel			
Distensión			

10. Si trata sus animales con medicamentos, ¿De dónde obtiene la información para hacerlo?
11. ¿Usted usa antibióticos para prevenir enfermedades? Sí No
12. Si lo hace, en qué ocasiones
13. Cuándo los animales están siendo tratados con antibióticos, ¿hay algún registro de esto? ¿Cómo identifican los animales a los que se les debe administrar el antibiótico?
14. Cuándo el tratamiento no funciona, ¿usted qué hace?
- Aumenta la dosis
  - Cambia el medicamento
  - No termina el tratamiento
  - Otro, cuál?
15. Cuándo compra antibióticos, qué factores tiene en cuenta:
- Precio
  - Marca
  - Calidad
  - Facilidad para conseguirlo
  - Recomendación del Médico Veterinario
  - Experiencia previa
  - Otro, cuál:
16. Siempre da la dosis recomendada por el médico veterinario o fabricante?  
Sí No
- Si su respuesta fue no, ¿Por qué?
- No hay suficiente dinero
  - Los animales han mejorado
  - El tratamiento no funciona
  - El animal pierde peso
  - Por los efectos secundarios
  - Otro, cuál:
17. ¿Cree que el uso de antibióticos puede resultar en lo siguiente?

**Peligro para los animales**

Reacción alérgica	Sí	No	No sabe
Disminuir la efectividad del medicamento por el uso frecuentemente del antibiótico	Sí	No	No sabe

**Peligro para el consumidor**

El consumo de productos cárnicos de animales	Sí	No	No sabe
--	----	----	---------

tratados con antibióticos puede generar algún riesgo para el consumidor

Otros riesgos, cuáles:

18. Ha observado alguna complicación o efecto secundario después de administrar antibióticos?

Sí	No	Cuáles?
<b>Trabajadores</b>		

Trabajador 1

19. Edad

20. Nivel de escolaridad

- a. Primaria completa
- b. Primaria incompleta
- c. Secundaria completa
- d. Secundaria incompleta
- e. Universidad completa
- f. Universidad Incompleta
- g. Ninguna de las anteriores

21. ¿Sabe qué es un antibiótico? Sí  No

Si lo sabe, defina qué es un antibiótico

22. ¿Sabe qué es resistencia a antibióticos? Sí  No

Si lo sabe, defina qué es resistencia a antibióticos

Trabajador 2

1. Edad

2. Nivel de escolaridad

- a. Primaria completa
- b. Primaria incompleta
- c. Secundaria completa
- d. Secundaria incompleta
- e. Universidad completa
- f. Universidad Incompleta
- g. Ninguna de las anteriores

3. ¿Sabe qué es un antibiótico? Sí  No

Si lo sabe, defina qué es un antibiótico

4. ¿Sabe qué es resistencia a antibióticos? Sí  No



## **Anexo C: Consentimiento informado**

**ID CRF \_\_\_\_\_**

### **INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TRABAJADOR DE GRANJA PORCICOLA**

El grupo de biofísica y biología de membranas del Universidad Nacional de Colombia, El grupo de resistencia a antimicrobianos de CORPOICA y el Laboratorio de Salud Pública de la Secretaria Distrital de Salud, están desarrollando una investigación que nos permitirá conocer como el uso de antibióticos en la industria porcina genera resistencia a antibioticos en animales y humanos. Lo que con llevará a un difícil tratamiento de infecciones. Queremos estudiar estas bacterias, ya que queremos saber si el contacto permanente que usted tiene con estos animales puede generar que las bacterias que son normales en su intestino sean tambien resistentes a antibioticos.

¿Por qué lo(a) invitamos a participar en este estudio? Usted ha sido invitado(a) a participar en este estudio porque está en contacto permanente con cerdos, en los cuales se utilizan antibióticos para profilaxis, tratamiento de infecciones y en alimentos para promover crecimiento animal. Con los datos que usted nos proporcione y el hisopado rectal que le tomaremos. Estudiaremos el efecto del uso de antibióticos en producción animal sobre la resistencia a antibióticos en bacterias de su flora normal,

Procedimientos del estudio: Usted es libre de decidir si participa o no en este estudio. Si usted decide participar VOLUNTARIAMENTE, le solicitaremos lo siguiente:

- Contestar unas preguntas generales sobre usted, tales como su edad, ocupación, lugar de vivienda, personas con las que vive, viajes al exterior y antecedentes médicos.
- Autorizarnos para estudiar las bacterias que se encuentren en la muestra de orina que le tomen en la clínica u hospital.

- Autorizar al médico de la institución a la cual usted consultó para contactarlo telefónicamente en el caso que requiramos información adicional acerca de cómo se encuentra su salud después de su salida de la clínica.

**Beneficios:** Usted no recibirá un beneficio directo por su participación en este estudio. El tratamiento suministrado para su infección será el que el médico de la institución a la que consultó considere el más apropiado. Su colaboración en este estudio ayudará a entender un poco más sobre el por qué a veces los antibióticos no funcionan contra algunas bacterias que causa infecciones urinarias. Esta información nos permitirá mejorar la manera de combatir esta infección y así el tratamiento (remedios que le recete su médico) será más efectivo para otras personas o incluso para usted si volviera a tener esta infección.

**Riesgos:** Este estudio no representa para usted ningún riesgo físico diferente a los que ya trae la infección y la atención médica que le tengan que brindar en la clínica a la que usted consultó. La información que usted nos proporcione será manejada con estricta confidencialidad y anonimato. La información recibida por CIDEIM y por la Secretaria Distrital de Salud de Bogotá será guardada bajo llave y la información que este en el computador solo la podrá ver las personas encargadas de la investigación que tengan la clave para entrar al computador. Si usted decide participar, se le asignará un número de identificación para que su nombre no sea escrito en ningún registro. Toda información que pueda permitir su identificación será destruida una vez se complete la recolección de datos.

**Derechos:** Usted tiene el derecho a saber cualquier nueva información que sea encontrada acerca de esta enfermedad. Si en algún momento durante este estudio se descubre nueva información, esta le será comunicada a todos los participantes a través de la institución a la que consultaron.

**Sus responsabilidades con el estudio:** Dar información real al momento de contestar las preguntas que se le realice.

**Confidencialidad:** Guardaremos privacidad acerca de los registros que puedan identificarlo hasta donde nos lo permita la ley. A sus muestras e información privada se les asignará un número para que su nombre no sea escrito en ningún registro y así usted no sea identificado por nombre en ningún momento. Las autoridades regulatorias Colombianas como la secretaria de salud y Corpoica, y otros grupos que

vigilarán el estudio, tendrán acceso a los datos para garantizar que el estudio está siendo realizado correctamente y que usted y sus datos personales están seguros.

**Compensación:** Este estudio no entrega ninguna compensación económica por su información o por la muestra de orina.

**Personas a contactar:** En el Laboratorio de Salud Pública siempre habrá personal dispuesto a responder cualquier inquietud que usted tenga o a ayudarlo si se presenta algún problema durante su participación..

**Nombre de la coordinadora de campo:** Yamile Adriana Celis Bustos, Teléfono: (1) 3 64 90 990 extensión 9929 o 9662

**Participación voluntaria y retiro del estudio:** Usted es libre de participar en el estudio o no. Si usted decide participar ahora, puede retirarse en cualquier momento por cualquier razón. Al retirarse usted no perderá ningún beneficio que normalmente pudiera tener si no participara en el estudio o se retirará antes de que este finalice.

**Aceptación:** Si usted no entiende el propósito de este estudio o de la información contenida en este documento, por favor pregunte. No participe si algo no es claro para usted. Su firma abajo indicara que usted ha leído este documento (o se lo han leído) y que ha decidido participar en el proyecto descrito en este consentimiento. Usted firmará dos copias de este formato y usted es libre de guardar una copia de este documento.

**Declaración de participación:** Confirmando que he leído y comprendido el texto que va desde la pagina No. 1 hasta la pagina No. 3 del presente documento (o este se me ha sido leído) y he tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre este Consentimiento Informado y sobre mi participación en este estudio, incluyendo los posibles riesgos y complicaciones asociados, y todas mis dudas han sido aclaradas por parte del investigador principal.

SU FIRMA (O HUELLA DIGITAL) INDICA QUE USTED HA DECIDIDO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN ESTE ESTUDIO.

	<b>1 Nombre (en letra clara)</b>	Documento de Identidad	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o Huella digital
Voluntario				
Médico o su delegado				

**Testigo:** Observé el proceso de consentimiento. El voluntario leyó este formato (o le ha sido leído), tuvo oportunidad de hacer preguntas, estuvo conforme con las respuestas y firmó (o colocó su huella digital) para entrar al estudio.

	<b>2 Nombre (en letra clara) y relación</b>	Documento de Identidad	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o Huella digital
1. Testigo				
2. Testigo				

**Autorización para guardar muestras:** Nosotros queremos guardar sus muestras después de que termine el estudio para completar o desarrollar otros estudios con ellas. Estos estudios podrán ser relacionados con la resistencia a antibióticos o con otras propiedades de las bacterias. Si se van a llevar a cabo estos estudios, primero deberán ser revisados y aprobados por un Comité de ética.

Si usted nos permite guardar su sus muestras, usted podrá cambiar de opinión en cualquier momento y solicitar que las muestras sean destruidas. Para este propósito puede contactar a:

**Nombre:** Yamile Adriana Celis

**Dirección:** Carrera 32 # 12-81

**Número de teléfono:** 3 64 90 90 ext. 9927-9929

Cuando usted firme abajo, esto mostrará que está de acuerdo con los procedimientos descritos inicialmente.

FIRME (O COLOQUE SU HUELLA DIGITAL) ABAJO SI USTED LIBRE Y VOLUNTARIAMENTE DECIDIÓ HACER PARTE DE ESTE ESTUDIO Y ACEPTA ESTOS PROCEDIMIENTOS.

	<b>3 Nombre (en letra clara)</b>	Documento Identidad	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o Huella digital
<b>Voluntario</b>				
<b>Médico o su delegado</b>				

**Testigo:** Observé el proceso de consentimiento. El voluntario leyó este formato (o le ha sido leído), tuvo oportunidad de hacer preguntas, estuvo conforme con las respuestas y firmó (o colocó su huella digital) para entrar al estudio.

	<b>4 Nombre (en letra clara) y relación</b>	Documento Identidad	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o Huella digital
<b>1. Testigo</b>				
<b>2. Testigo</b>				

Acepto que me tomen un hisopado nasal y uno rectal.

**No** acepto que me tomen un hisopado nasa y/o rectal.

Firma: \_\_\_\_\_

## Bibliografia

- Aarestrup, F. M., Kruse, H., Tast, E., Hammerum, A. M., & Jensen, L. B. (2000). 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*, 6(1), 63–70. Journal Article. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10868809>
- Aarestrup, F. M., Oliver Duran, C., & Burch, D. G. (2008). Antimicrobial resistance in swine production. *Anim Health Res Rev*, 9(2), 135–148. Journal Article. <http://doi.org/S1466252308001503> [pii]10.1017/S1466252308001503
- Aibinu, I., Odugbemi, T., Koenig, W., & Ghebremedhin, B. (2012). Sequence Type ST131 and ST10 Complex (ST617) predominant among CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates from Nigeria. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), E49–E51. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03730.x>
- Alcaide, E., Blasco, M. D., & Esteve, C. (2005). Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. *Appl Environ Microbiol*, 71(6), 3348–3350. Journal Article. <http://doi.org/71/6/3348> [pii]10.1128/AEM.71.6.3348-3350.2005
- Alcaide, E., Blasco, M. D., & Esteve, C. (2010). Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Res Microbiol*, 161(1), 40–45. Journal Article. [http://doi.org/S0923-2508\(09\)00215-0](http://doi.org/S0923-2508(09)00215-0) [pii]10.1016/j.resmic.2009.10.006
- Amsterdamska, O. (1987). Medical and biological constraints: early research on variation in bacteriology. *Soc Stud Sci*, 17(4), 657–687. Journal Article. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11612359>
- Amsterdamska, O. (1991). Stabilizing instability: the controversy over cyclogenic theories of bacterial variation during the interwar period. *Journal of the History of Biology*, 24(2), 191–222. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11612552>
- Amsterdamska, O. (1993). From Pneumonia to DNA : The Research Career of Oswald T . Avery. *Historical Studies in the Physical and Biological ...*, 24(1), 1–40. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/10.2307/27757711>

- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*, 8(4), 260–271. Journal Article. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2319>
- Arkwright, J. (1921). Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1700240104/abstract>
- Ashbolt, N. J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K. K., Collignon, P., ... Topp, E. (2013). Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 993–1001. <http://doi.org/10.1289/ehp.1206316>
- Avery, O., MacLeod, C., & McCarty, M. (1943). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *Resonance*, 79(6), 137–158. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/g345284417660444.pdf>
- Bai, L., Hurley, D., Li, J., Meng, Q., Wang, J., Fanning, S., & Xiong, Y. (2016). Characterisation of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* cultured from pigs in China: co-occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and *mcr-1*-encoding genes on plasmids. *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 48). <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.021>
- Baquero, F. (2012). On the Shifting Balance: the Case of *Staphylococcus aureus* CC398. *MBio*, 3(2). Journal Article. <http://doi.org/mBio.00078-12> [pii]10.1128/mBio.00078-12
- Baquero, F., Lanza, V. F., Cantón, R., & Coque, T. M. (2015). Public health evolutionary biology of antimicrobial resistance: priorities for intervention. *Evolutionary Applications*, 8(3), 223–39. <http://doi.org/10.1111/eva.12235>
- Barnett, J. a. (2004). A history of research on yeasts 7: enzymic adaptation and regulation. *Yeast (Chichester, England)*, 21(9), 703–46. <http://doi.org/10.1002/yea.1113>
- Baym, M., Stone, L. K., & Kishony, R. (2015). Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science*, 351(6268), aad3292-aad3292.

<http://doi.org/10.1126/science.aad3292>

BD Phoenix <sup>TM</sup>. (2008). *BD Phoenix* <sup>TM</sup>.

Benito, D., Gómez, P., Aspiroz, C., Zarazaga, M., Lozano, C., & Torres, C. (2016). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 34(5), 280–285. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008>

Benito, D., Gómez, P., Aspiroz, C., Zarazaga, M., Lozano, C., & Torres, C. (2015). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008>

Bettelheim, K. A., Hornitzky, M. A., Djordjevic, S. P., & Kuzevski, A. (2003). Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans. *J Med Microbiol*, 52(Pt 2), 155–162. Journal Article. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543922>

Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C. L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., ... Archambault, M. (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6753–61. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6753-6761.2005>

Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos*.

Cantón, R., Horcajada, J. P., Oliver, A., Garbajosa, P., & Vila, J. (2013). Inappropriate use of antibiotics in hospitals: The complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 31(Suple 4), 3–11. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70010-0](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70010-0)

Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*, 11(5), 477–485. Journal Article. [http://doi.org/S1471-4892\(11\)00129-9](http://doi.org/S1471-4892(11)00129-9) [pii]10.1016/j.coph.2011.07.007

Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of*

*Medical Microbiology*, 303(6–7), 298–304.

<http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>

Carlsson, S. (2012). DANMAP.

Cars, O., Monnet, D. L., Nordberg, P., & (STRAMA), S. S. P. for T. R. U. of A. A. and S. of R. (2005). *Antibacterial Drug Resistance (Background Document for the WHO Project: Priority Medicines for Europe and the World) (Report)*.

Carson, R. T., Larson, E., Levy, S. B., Marshall, B. M., & Aiello, A. E. (2008). Use of antibacterial consumer products containing quaternary ammonium compounds and drug resistance in the community. *J Antimicrob Chemother*, 62(5), 1160–1162. Journal Article. <http://doi.org/dkn332> [pii]10.1093/jac/dkn332

Catry, B., Cavaleri, M., Baptiste, K., Grave, K., Grein, K., Holm, A., ... Edo, J. T. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(3), 297–306. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005>

Cercenado Emilia, C. R. (2008). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Seimc.Org. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>

Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., & Yuan, Z. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology*, 5, 217. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00217>

Clewell, D., Weaver, K., Dunny, G., Coque, T., Francia, M., & Hayes, F. (2014). Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, (February), 1–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649510>

Cohen, S. N. (1993). Bacterial plasmids: their extraordinary contribution to molecular genetics. *Gene*, 135(1–2), 67–76. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276280>

- Cole, L. J., & Wright, W. H. (1916). Application of the Pure-Line Concept to Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 19(2), 209–221. Journal Article. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/30080320>
- Cortés, P., Blanc, V., & Mora, A. (2010). Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial resistant Escherichia coli strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and ...* <http://doi.org/10.1128/AEM.02421-09>
- Courvalin, P. (2008a). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med*, 264(1), 4–16. Journal Article. <http://doi.org/JIM1940> [pii]10.1111/j.1365-2796.2008.01940.x
- Courvalin, P. (2008b). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 264(1), 4–16. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01940.x>
- Creager, A. N. (2007). Adaptation or selection? Old issues and new stakes in the postwar debates over bacterial drug resistance. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*, 38(1), 159–190. Journal Article. [http://doi.org/S1369-8486\(06\)00096-3](http://doi.org/S1369-8486(06)00096-3) [pii] 10.1016/j.shpsc.2006.06.016
- Cromwell, G. L. (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*, 13(March 2015), 7–27. <http://doi.org/10.1081/ABIO-120005767>
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, 65(3), 490–495. Journal Article. <http://doi.org/dkp498> [pii]10.1093/jac/dkp498
- Daniel, D. S., Lee, S. M., Dykes, G. A., & Rahman, S. (2015). Public Health Risks of Multiple-Drug-Resistant Enterococcus spp. in Southeast Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6090–7. <http://doi.org/10.1128/AEM.01741-15>
- DANMAP. (2014). *Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark*. <http://doi.org/ISSN 1600-2032>

- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3), 417–43YAMILE23. Journal Article. <http://doi.org/74/3/417> [pii] 10.1128/MMBR.00016-10
- Davies, J., Spiegelman, G. B., & Yim, G. (2006). The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol*, 9(5), 445–453. Journal Article. [http://doi.org/S1369-5274\(06\)00128-7](http://doi.org/S1369-5274(06)00128-7) [pii]10.1016/j.mib.2006.08.006
- Davis, B. (1950). NONFILTRABILITY OF THE AGENTS OF GENETIC RECOMBINATION IN ESCHERICHIA COLI. *Journal of Bacteriology*, 507–508. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC385908/>
- Demerec, M. (1945). Production of Staphylococcus strains resistant to various concentrations of penicillin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of ...*, 16–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1078743/>
- Demerec, M. (1948). ORIGIN OF BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS'. *Journal of Bacteriology*. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/56/1/63.full.pdf>
- Depardieu, F., Perichon, B., & Courvalin, P. (2004). Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR, 42(12), 5857–5860. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5857>
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., & Courvalin, P. (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 79–114. <http://doi.org/10.1128/CMR.00015-06>
- Dewulf, J., Catry, B., Timmerman, T., Opsomer, G., De Kruif, A., & Maes, D. (2007). Tetracycline-resistance in lactose-positive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: Degree of resistance, multiple resistance and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, 339–351. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.11.001>
- Donado-Godoy, P., Byrne, B. A., León, M., Castellanos, R., Vanegas, C., Coral, A., ... Smith, W. A. (2015). Prevalence, resistance patterns, and risk factors for antimicrobial resistance in bacteria from retail chicken meat in Colombia. *Journal of Food Protection*, 78(4), 751–9. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-349>
- Donado-Godoy, P., Castellanos, R., León, M., Arevalo, A., Clavijo, V., Bernal, J., ...

- Perez-Gutierrez, E. (2015). The Establishment of the Colombian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (COIPARS): A Pilot Project on Poultry Farms, Slaughterhouses and Retail Market. *Zoonoses and Public Health*, 62 Suppl 1, 58–69. <http://doi.org/10.1111/zph.12192>
- Donado-Godoy, P., Clavijo, V., León, M., Tafur, M. A., Gonzales, S., Hume, M., ... Doyle, M. P. (2012). Prevalence of Salmonella on retail broiler chicken meat carcasses in Colombia. *Journal of Food Protection*, 75(6), 1134–8. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-513>
- EFSA - European Food Safety Authority. (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans , animals and food in the European Union in 2011. *EFSA Journal*, 11(5), 1–359. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3196>. Available
- Eileen R. Choffnes and Alison Mack, Rapporteurs, D. A. R. (2010). Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies. Electronic Book, Washington DC: National Academies Press.
- Engelstädter, J., Harms, K., & Johnsen, P. J. (2016). The evolutionary dynamics of integrons in changing environments. *The ISME Journal*. <http://doi.org/10.1038/ismej.2015.222>
- Enne, V. I., Delsol, A. A., Davis, G. R., Hayward, S. L., Roe, J. M., & Bennett, P. M. (2005). Assessment of the fitness impacts on Escherichia coli of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J Antimicrob Chemother*, 56(3), 544–551. Journal Article. <http://doi.org/dki255> [pii]10.1093/jac/dki255
- EUROPE, W. H. O. R. O. F. O. R. (2011). European strategic action plan on antibiotic resistance. Government Document, Baku, Azerbaijan,.
- Farkas, A., Crăciunaș, C., Chiriac, C., Szekeres, E., Coman, C., & Butiuc-Keul, A. (2016). Exploring the Role of Coliform Bacteria in Class 1 Integron Carriage and Biofilm Formation During Drinking Water Treatment. *Microbial Ecology*, pp. 1–10. <http://doi.org/10.1007/s00248-016-0758-0>
- Fildes, P., & Whitaker, K. (1948). Training or mutation of bacteria. *British Journal of*

*Experimental Pathology*, 29(3), 240–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2074242&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Freeman-Cook Lisa, F.-C. K., & Edward, A. (2005). *Staphylococcus Aureus Infections (Deadly Diseases & Epidemics)*. Book, Chelsea House Publications.

Freitas, A. R., Novais, C., Ruiz-Garbajosa, P., Coque, T. M., & Peixe, L. (2009). Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(6), 1104–11. <http://doi.org/10.1093/jac/dkp103>

Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Frontiers in Microbiology*, 4, 135. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00135>

Gedebjerg, A., Hasman, H., Sørensen, C. M., & Wang, M. (2015). An OXA-48-producing *Escherichia coli* isolated from a Danish patient with no hospitalization abroad. *Infectious Diseases (London, England)*, 47(8), 593–5. <http://doi.org/10.3109/23744235.2015.1019920>

Gerzova, L., Babak, V., Sedlar, K., Faldynova, M., Videnska, P., Cejkova, D., ... Rychlik, I. (2015). Characterization of antibiotic resistance gene abundance and microbiota composition in feces of organic and conventional pigs from four EU countries. *PLoS ONE*, 10(7), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132892>

Gonzalez-zorn, B., González-zorn, B., & Escudero, J. A. (2016). Ecology of antimicrobial resistance : Humans , animals , food and environment Ecology of antimicrobial resistance : humans , animals , food and environment, (April). <http://doi.org/10.2436/20.1501.01.163>

Government of Canada, P. H. A. of C. (2012). Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) - Public Health Agency Canada [Web Page]. Retrieved from <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/index-eng.php>

- Hadley, P. (1927). Microbic Dissociation : The Instability of Bacterial Species with Special Reference to Active Dissociation and Transmissible Autolysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 40(1), 1–312. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/10.2307/30083414>
- Hayes, W. (1952). Recombination in Bact. coil K 12: Unidirectional Transfer of Genetic Material. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v169/n4290/abs/169118b0.html>
- He, T., Shen, Y., Schwarz, S., Cai, J., Lv, Y., Li, J., ... Wang, Y. (2016). Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1466–1473. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw016>
- Herrick, J. B., Haynes, R., Heringa, S., Brooks, J. M., & Sobota, L. T. (2014). Co-Selection for Resistance to Multiple Late-Generation Human Therapeutic Antibiotics Encoded on Tetracycline Resistance Plasmids Captured from Uncultivated Stream and Soil Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. <http://doi.org/10.1111/jam.12538>
- Herrick, J. B., Haynes, R., Heringa, S., Brooks, J. M., & Sobota, L. T. (2014). Coselection for resistance to multiple late-generation human therapeutic antibiotics encoded on tetracycline resistance plasmids captured from uncultivated stream and soil bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 380–389. <http://doi.org/10.1111/jam.12538>
- Holguín, A. V, Rangel, G., Clavijo, V., Prada, C., Mantilla, M., Gomez, M. C., ... Vives, M. J. (2015). Phage  $\Phi$ Pan70, a Putative Temperate Phage, Controls *Pseudomonas aeruginosa* in Planktonic, Biofilm and Burn Mouse Model Assays. *Viruses*, 7(8), 4602–23. <http://doi.org/10.3390/v7082835>
- Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421–33. <http://doi.org/10.4161/viru.21282>
- Hong, P.-Y., Al-Jassim, N., Ansari, M. I., & Mackie, R. I. (2013). Environmental and Public Health Implications of Water Reuse: Antibiotics, Antibiotic Resistant Bacteria, and Antibiotic Resistance Genes. *Antibiotics*, 2(February 2016), 367–399. <http://doi.org/10.3390/antibiotics2030367>

- Hsu, J.-T., Chen, C.-Y., Young, C.-W., Chao, W.-L., Li, M.-H., Liu, Y.-H., ... Ying, C. (2014). Prevalence of sulfonamide-resistant bacteria, resistance genes and integron-associated horizontal gene transfer in natural water bodies and soils adjacent to a swine feedlot in northern Taiwan. *Journal of Hazardous Materials*, 277, 34–43. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.02.016>
- Hsu, S. C., Chiu, T. H., Pang, J. C., Hsuan-Yuan, C. H., Chang, G. N., & Tsen, H. Y. (2006). Characterisation of antimicrobial resistance patterns and class 1 integrons among *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis strains isolated from humans and swine in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents*, 27(5), 383–391. Journal Article. [http://doi.org/S0924-8579\(06\)00055-0](http://doi.org/S0924-8579(06)00055-0) [pii]10.1016/j.ijantimicag.2005.11.020
- Ibekwe, A. M., Murinda, S. E., & Graves, A. K. (2011). Microbiological evaluation of water quality from urban watersheds for domestic water supply improvement. *Int J Environ Res Public Health*, 8(12), 4460–4476. Journal Article. <http://doi.org/ijerph-08-04460> [pii]10.3390/ijerph8124460
- IFPMA. (2016). *Declaration by the Pharmaceutical, Biotechnology and Diagnostics Industries on Combating Antimicrobial Resistance*.
- Jacob, F. (1960). [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences*, 250, 1727–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14406329>
- Jensen, L. B., Garcia-Migura, L., Valenzuela, A. J. S., L??hr, M., Hasman, H., & Aarestrup, F. M. (2010). A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 80(1), 25–43. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.10.012>
- Johnson, J. R., R, U., Dobrindt, U., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., ... Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli* : an old friend with new tidings, (February), 1–27. <http://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- Jordan, D., Morris, S. G., Gill, P., Andersen, L. M., Chowdhury, A., Stevenson, A. E., & Spence, S. A. (2005). Mass screening for antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dairy cows in northern New South Wales. *Aust Vet J*, 83(11), 688–694. Journal

Article. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16315669>

- Jurado G, H., Aguirre F, D., & Ramirez T, C. (2009). Characterization of Isolated Probiotic Bacteria of the Large Intestine of Pigs As Alternative To Using Antibiotics. *Revista Mvz Cordoba*, 14(2), 1723–1735. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000275889300009
- Kamboj, M., Cohen, N., Gilhuley, K., Babady, N. E., Seo, S. K., & Sepkowitz, K. A. (2011). Emergence of daptomycin-resistant VRE: experience of a single institution. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 32(4), 391–4. <http://doi.org/10.1086/659152>
- Karczmarczyk, M., Martins, M., Quinn, T., Leonard, N., & Fanning, S. (2011). Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Appl Environ Microbiol*, 77(20), 7113–7120. Journal Article. <http://doi.org/AEM.00600-11> [pii]10.1128/AEM.00600-11
- Keen, P. L., & Montforts, M. H. M. M. (2012). *Antimicrobial resistance in the environment*. Book, Hoboken, N.J.: Wiley.
- Keese, P. (2008). Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environ Biosafety Res*, 7(3), 123–149. Journal Article. <http://doi.org/10.1051/ebr:2008014>
- Khalifa, H. O., Ahmed, A. M., Oreiby, A. F., Eid, A. M., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2016). Characterisation of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolated from animals in Egypt. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.02.011>
- Kohanski, M. A., DePristo, M. A., & Collins, J. J. (2010). Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell*, 37(3), 311–320. Journal Article. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>
- Kohler, R. (1985). Innovation in normal science: Bacterial physiology. *Isis*, 76(2), 162–181. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/10.2307/231745>
- Koonin, E. V, & Wolf, Y. I. (2009). Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? *Biol Direct*, 4, 42. Journal Article. <http://doi.org/10.1186/1745-6150-4-42> [pii]10.1186/1745-6150-4-42

- Lederberg, J. (1947). Gene recombination and linked segregations in *Escherichia coli*. *Genetics*, 32(5), 505–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18903840>
- Lederberg, J. (1952). Cell Genetics and Hereditary Symbiosis. *Physiol. Rev*, (497). Retrieved from <http://profiles.nlm.nih.gov/ps/access/BBABFO.pdf>
- Lederberg, J. (1998). Plasmid ( 1952 – 1997 ). *Plasmid*, 9, 1–9. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147619X97913202>
- Lederberg, J. (2000). Infectious history. *Science*, 288(5464), 287–293. Journal Article. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777411>
- Lederberg, J., & Lederberg, E. M. (1952). Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, 63(3), 399–406. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1203627&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lepper, P. M., Grusa, E., Reichl, H., Högel, J., & Trautmann, M. (2002). Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2920–5. <http://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2920-2925.2002>
- Levy, S. B. (2005). Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(10), 1446–1450. Journal Article. [http://doi.org/S0169-409X\(05\)00097-9](http://doi.org/S0169-409X(05)00097-9) [pii]10.1016/j.addr.2005.04.001
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*, 10(12 Suppl), S122-9. Journal Article. <http://doi.org/nm1145> [pii]10.1038/nm1145
- Liassine, N., Assouvie, L., Descombes, M.-C., Tendon, V. D., Kieffer, N., Poirel, L., & Nordmann, P. (2016). Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 51). <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.008>
- Linhares, L. L., Yang, M., Sreevatsan, S., Munoz-Zanzi, C. A., Torremorell, M., & Davies, P. R. (2015). The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* :

*Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 27(1), 55–60. <http://doi.org/10.1177/1040638714559598>

- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Liu, Y., Liu, K., Lai, J., Wu, C., Shen, J., & Wang, Y. (2013). Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species of food animal origin from Beijing and Shandong Province, China. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 555–563. <http://doi.org/10.1111/jam.12054>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Livermore, D. M. (2012). Fourteen years in resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 283–294. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.12.012>
- Lozano, C., Garc??a-Migura, L., Aspiroz, C., Zarazaga, M., Torres, C., & Aarestrup, F. M. (2012). Expansion of a plasmid classification system for gram-positive bacteria and determination of the diversity of plasmids in Staphylococcus aureus strains of human, animal, and food origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5948–5955. <http://doi.org/10.1128/AEM.00870-12>
- Luria, S. E., & Delbrück, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*, 28(6), 491–511. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1209226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Malachowa, N., & Deleo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(18), 3057–3071. <http://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>

- Malhotra-Kumar, S., Xavier, B. B., Das, A. J., Lammens, C., Hoang, H. T. T., Pham, N. T., & Goossens, H. (2015). Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. *The Lancet Infectious Diseases*, (JANUARY), 19–20. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00014-1](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00014-1)
- Malhotra-Kumar, S., Xavier, B. B., Das, A. J., Lammens, C., Hoang, H. T. T., Pham, N. T., & Goossens, H. (2016). Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. *The Lancet Infectious Diseases*. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00014-1](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00014-1)
- Marciano, D. C., Karkouti, O. Y., & Palzkill, T. (2007). A fitness cost associated with the antibiotic resistance enzyme SME-1 beta-lactamase. *Genetics*, 176(4), 2381–2392. Journal Article. <http://doi.org/10.1534/genetics.106.069443>
- Maria Virginia Villegas Adriana Correa, Beatriz Vanegas, Cesar Arias, Jinnethe Reyes, John P. Quinn, F. P. (2002). Fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* in community infections and in poultry in Colombia. *Infectious Diseases Society of America 40th Meeting*. Conference Paper, Estados Unidos. Retrieved from [http://201.234.78.173:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod\\_rh=0000204544](http://201.234.78.173:8081/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000204544)
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. <http://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*, 24(4), 718–733. Journal Article. <http://doi.org/24/4/718> [pii]10.1128/CMR.00002-11
- Martin Dworkin, S. F. (2006). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. (Springer, Ed.) (Third Edit, Vol. 6). Book.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut*, 157(11), 2893–2902. Journal Article. [http://doi.org/S0269-7491\(09\)00294-2](http://doi.org/S0269-7491(09)00294-2) [pii]10.1016/j.envpol.2009.05.051
- Martinez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal*

- Society*, 276(1667), 2521–2530. <http://doi.org/10.1098/rspb.2009.0320>
- Martinez Cruz, P., Ibanez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A., & Ramirez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol*, 2012, 916845. <http://doi.org/10.5402/2012/916845>
- McCarthy, A. J., & Lindsay, J. A. (2012). The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BMC Microbiology*, 12, 104. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-12-104>
- McDermott, P. F., Walker, R. D., & White, D. G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology*, 22(2), 135–143. <http://doi.org/10.1080/10915810305089>
- Morgan, M. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J Antimicrob Chemother*, 62(6), 1181–1187. Journal Article. <http://doi.org/dkn405> [pii]10.1093/jac/dkn405
- Moubareck, C., Meziane-Cherif, D., Courvalin, P., & Périchon, B. (2009). VanA-type *Staphylococcus aureus* strain VRSA-7 is partially dependent on vancomycin for growth. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(9), 3657–3663. Journal Article. <http://doi.org/AAC.00338-09> [pii]10.1128/AAC.00338-09
- Neuhauser, M. M. (2003). Antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA*, 289, 885–888. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1001/jama.289.7.885>
- Pál, C., Papp, B., & Lercher, M. J. (2005). Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nat Genet*, 37(12), 1372–1375. Journal Article. <http://doi.org/ng1686> [pii]10.1038/ng1686
- Pantosti, A. (2012). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. *Front Microbiol*, 3, 127. Journal Article. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00127>
- Pereira, R. V., Siler, J. D., Ng, J. C., Davis, M. A., Grohn, Y. T., & Warnick, L. D. (2014). Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal *Escherichia coli* of preweaned dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7644–7654. <http://doi.org/10.3168/jds.2014-8521>

- Petersen, A., Aarestrup, F. M., & Olsen, J. E. (2009a). The in vitro fitness cost of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* varies with the growth conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 299(1), 53–59. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01734.x>
- Petersen, A., Aarestrup, F. M., & Olsen, J. E. (2009b). The in vitro fitness cost of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* varies with the growth conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 299(1), 53–59. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01734.x>
- Poirel, L., Kieffer, N., Liassine, N., Thanh, D., & Nordmann, P. (2016). Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *The Lancet Infectious Diseases*. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00006-2](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00006-2)
- Quesada, A., Ugarte-Ruiz, M., Iglesias, M. R., Porrero, M. C., Martínez, R., Florez-Cuadrado, D., ... Domínguez, L. (2016). *Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in Escherichia coli and Salmonella enterica isolated from poultry and swine in Spain. Research in Veterinary Science (Vol. 105)*. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.003>
- Quintana-Hayashi, M. P., & Thakur, S. (2012). Longitudinal study of the persistence of antimicrobial-resistant campylobacter strains in distinct Swine production systems on farms, at slaughter, and in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 78(8), 2698–2705. Journal Article. <http://doi.org/AEM.07723-11> [pii]10.1128/AEM.07723-11
- Rajic, A., Reid-Smith, R., Deckert, A. E., Dewey, C. E., & McEwen, S. A. (2006). Reported antibiotic use in 90 swine farms in Alberta. *Can Vet J*, 47(5), 446–452. Journal Article.
- Rasschaert, G., Michiels, J., Arijs, D., Wildemaue, C., De Smet, S., & Heyndrickx, M. (2012). Effect of farm type on within-herd *Salmonella* prevalence, serovar distribution, and antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection*, 75(5), 859–66. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-469>
- Redding, L. E., Cubas-Delgado, F., Sammel, M. D., Smith, G., Galligan, D. T., Levy, M. Z., & Hennessy, S. (2014). The use of antibiotics on small dairy farms in rural

- Peru. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(1), 88–95.  
<http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.012>
- Rocha-Gracia, R. C., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Bello, F., Martínez-Laguna, Y., & Torres, C. (2015). Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2  $\beta$ -lactamases. *Veterinary Journal*, 203(3), 315–319. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.026>
- Rodriguez, F., & Castro, M. (2005). Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica*, 6(1), 26–38. Retrieved from [http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Revista/v6n1\\_p26\\_38\\_levaduras\\_prebrobiotics.pdf](http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Revista/v6n1_p26_38_levaduras_prebrobiotics.pdf)
- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25(1), 39–67. Journal Article. [http://doi.org/S0168-6445\(00\)00040-1](http://doi.org/S0168-6445(00)00040-1) [pii]
- Saavedra, S., Arévalo, A., Ovalle, M., Montaña, L., & Hidalgo, A. (2016). *Alerta por la primera detección de mcr-1 gen de resistencia a colistina en aislamientos de Salmonella entérica serovar Typhimurium y Escherichia coli de origen humano en Colombia.*
- SDS, S. D. de S. (2014). *Boletín Epidemiológico Resistencia Bacteriana año 2014.*
- Seni, J., Falgenhauer, L., Simeo, N., Mirambo, M. M., Imirzalioglu, C., Matee, M., ... Mshana, S. E. (2016). Multiple ESBL-producing *Escherichia coli* sequence types carrying quinolone and aminoglycoside resistance genes circulating in companion and domestic farm animals in Mwanza, Tanzania, harbor commonly occurring plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 7(February), 1–8.  
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00142>
- Serisier, D. J. (2013). Risks of population antimicrobial resistance associated with chronic macrolide use for inflammatory airway diseases. *The Lancet Respiratory Medicine*, 1(3), 262–274. [http://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70038-9](http://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70038-9)
- Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., & Wu, C. (2016). Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *The Lancet Infectious Diseases*.  
[http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00061-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X)

- Stephenson, M., & Gale, E. (1937). THE ADAPTABILITY OF GLUCOZYMASE AND GALACTOZYMASE IN BACTERIUM COLI. *Biochemical Journal*, (June), 1311–1315. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1267078/>
- Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 790–819. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x>
- Sun, J., Yang, M., Sreevatsan, S., & Davies, P. R. (2015). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* in Growing Pigs in the USA. *PloS One*, 10(11), e0143670. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0143670>
- Sykes, R. (2010). The 2009 Garrod lecture: the evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1842–52. <http://doi.org/10.1093/jac/dkq217>
- Tatum, E. L., & Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 53(6), 673–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20251256>
- Tello, A., Austin, B., & Telfer, T. (2012). Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. *Environmental Health Perspectives*, (May). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3440082/>
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of Medicine*, 119(6 SUPPL. 1). <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011). Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 35(5), 912–935. Journal Article. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x>
- van Gerwe, T. J. (2012). Poultry meat as a source of human campylobacteriosis. *Tijdschr Diergeneeskd*, 137(3), 172–176. Journal Article. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22512063>
- Varga, C., Rajic, A., & McFall, M. (2009). Associations between reported on farm antimicrobial use practices and observed antimicrobial resistance in generic fecal

- Escherichia coli isolated from Alberta finishing swine farms. *Preventive Veterinary ...*, 88, 185–192. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.10.002>
- Varga, C., Rajić, A., McFall, M. E., Reid-Smith, R. J., Deckert, A. E., Checkley, S. L., & McEwen, S. A. (2009). Associations between reported on-farm antimicrobial use practices and observed antimicrobial resistance in generic fecal Escherichia coli isolated from Alberta finishing swine farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(3), 185–192. <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.10.002>
- Walsh, C. (2003). *Antibiotics actions, origins, resistance*. (A. society for Microbiology, Ed.). Book, Washington, DC.: ASM Press.
- Watanabe, T. (1963). Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological Reviews*, 27, 87–115. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=441171&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., ... Williams, a P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155–65. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)
- WHO. (2001). ORIGINAL : ENGLISH WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. *World Health, WHO/CDS/CS*, 105. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:WHO+Global+St+strategy+for+Containment+of+Antimicrobial+Resistance#0>
- WHO. (2009). *Community-Based Surveillance of Antimicrobial Use and Resistance in Resource-Constrained Settings*. (E. D. M. R. S. N. 037, Ed.), *Who Press*. Book.
- WHO. (2014a). *Antimicrobial Resistance, Global Report On Surveillance*. Retrieved from <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- WHO. (2014b). Antimicrobial resistance: global report on surveillance, 232. <http://doi.org/1.4.2014>
- WHO/EURO. (2012). Tackling Antibiotic Resistance from a Food Safety Perspective in Europe [Web Page]. Retrieved from

<http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js18396en/>

WHO, W. H. O. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance., Geneva: World Health Organization. Retrieved from [http://www.who.int/drugresistance/global\\_action\\_plan/en/](http://www.who.int/drugresistance/global_action_plan/en/)

Wiedenbeck, J., & Cohan, F. M. (2011). Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 957–976. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x>

Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Wang, M., & Zeng, Z. (2015). Selective pressure of antibiotics on ARGs and bacterial communities in manure-polluted freshwater-sediment microcosms. *Frontiers in Microbiology*, 6, 194. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00194>

Ye, X., Wang, X., Fan, Y., Peng, Y., Li, L., Li, S., ... Chen, S. (2016). Genotypic and phenotypic markers of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC9 in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.00091-16. <http://doi.org/10.1128/AEM.00091-16>

Yudkin, J. (1936). ENZYME VARIATION IN MICROORGANISMS. *Biological Reviews*, (October). Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-185X.1938.tb00508.x/abstract>

Yvonne Agerso, A. M. H. (2010). DANMAP: Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark [Web Page]. Retrieved from <http://www.danmap.org/AboutDanmap.aspx>

Zaidi, M. B., Campos, F. D., Estrada-García, T., Gutierrez, F., León, M., Chim, R., & Calva, J. J. (2012). Burden and transmission of zoonotic foodborne disease in a rural community in Mexico. *Clin Infect Dis*. Journal Article. <http://doi.org/cis300> [pii]10.1093/cid/cis300

Zeng, K. J., Doi, Y., Patil, S., Huang, X., & Tian, G. B. (2016). Emergence of the plasmid-mediated mcr-1 gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3862–3863. <http://doi.org/10.1128/AAC.00345-16>

Zhang, L., Lü, X., & Zong, Z. (2013). The emergence of blaCTX-M-15-carrying *Escherichia coli* of ST131 and new sequence types in Western China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(Table 1), 35.  
<http://doi.org/10.1186/1476-0711-12-35>