



---

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



ESCUELA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS EN CEPAS DE  
ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE HISOPADOS CLOACALES DE  
TORTUGAS DEL HERPETARIO "COATLCALLI" DE LA ESCUELA DE  
BIOLOGÍA DE LA BUAP.

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGO (A)

PRESENTA:

GABRIELA MORENO SÁNCHEZ

TUTOR (A): DRA. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

Diciembre 2014

# ÍNDICE

	Página
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
I.1 Antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	4
I.1.2 Clasificación.....	5
I.1.3 Mecanismo de acción.....	8
I.1.4 Origen y evolución de BLEE.....	9
I.1.5 BLEE.....	10
I.1.5.1 Enzimas tipo CTX-M.....	10
I.1.5.2 Enzimas tipo SHV.....	11
I.1.5.3 Enzimas tipo TEM.....	12
I.1.5.4 Enzimas tipo OXA.....	13
I.1.6 Diseminación de BLEE.....	13
I.2.1 Clasificación.....	14
I.2.2 Mecanismo de acción.....	15
I.2.3 Resistencia bacteriana a quinolonas.....	16
I.2.4 Resistencia plasmídica a quinolonas.....	16
I.2.4.1 Proteínas Qnr.....	17
I.2.4.2 Enzima Aac(6')-Ib-cr.....	17
I.2.4.3 Bomba de eflujo QepA.....	18
I.2.4.4 Bombas de eflujo OqxA y OqxB.....	19
I.3 Resistencia a aminoglucósidos.....	20
I.4 Resistencia a Tetraciclinas.....	20
<b>III. OBJETIVO GENERAL</b> .....	26
<b>IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	26
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	27
V.1 Recolección de las muestras para el aislamiento de Enterobacterias ( <i>E. coli</i> ) resistentes a cefotaxima (CTX <sup>R</sup> ).....	27
V.2 Identificación bacteriana.....	27
V.3 Determinación del perfil de susceptibilidad.....	28
Procedimiento.....	28
V.4 Producción fenotípica de BLEE.....	30
V.5 Amplificación de genes codificantes de BLEE.....	31
V.6 Templado para la amplificación.....	32

V.7 Condiciones para las PCR .....	32
V.8 Visualización de los productos de PCR.....	37
V.9 Purificación de los productos de PCR .....	37
V.10 Secuenciación de los genes amplificados .....	37
V.11 Análisis de las secuencias .....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>48</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>50</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura	Tabla	Título	Página
1		Anillo $\beta$ -lactámico, estructura principal de los antibióticos betalactámicos.	5
	1	Clasificación de las cefalosporinas.	6
2		Estructura química de los antibióticos betalactámicos e inhibidor de las betalactamasas.	7
	2	Antibióticos, concentración y diámetro del halo de inhibición (en milímetros) utilizados en la determinación del perfil de resistencia.	29
3		Mecanismo de acción de los betalactámicos.	9
	3	Primers utilizados para la amplificación de genes codificantes de BLEE.	31
4		Sustituciones de aminoácidos en los derivados de la betalactamasa SHV.	11
	4	Condiciones utilizadas para la amplificación de genes codificantes de BLEE.	33
5		Sustituciones de aminoácidos en los derivados de la betalactamasa TEM.	12
	5	Primers utilizados para la amplificación de genes codificantes de resistencia a quinolonas.	34
6		Estructura básica de las quinolonas, ácido 4-quinolín-3-carboxílico.	14
	6	Condiciones utilizadas para la amplificación de genes codificantes de resistencia a quinolonas.	35
7		Disposición de los discos en el método de difusión con doble disco.	30
	7	Componentes y cantidades empleadas en cada PCR.	36
8		Crecimiento de <i>E. coli</i> en medio Levine con CTX (2 $\mu$ g/mL), colonias verde brillantes.	38
	8	Origen, especie y sexo de las tortugas muestreadas.	38
9		Fenotipo BLEE positivo. Prueba de difusión con doble disco; se observa el sinergismo entre 4 antibióticos beta-lactámicos y el disco de amoxicilina/ácido clavulánico en el centro.	39
	9	Identificación de las 13 cepas CTX <sup>R</sup> recuperadas de los hisopados cloacales.	39
10		Genes amplificados.	42
	10	Perfil de resistencia y fenotipo BLEE de las 13 <i>E. coli</i> CTX <sup>R</sup>	40
11		Región del promotor-atenuador del gen <i>ampC</i> de <i>E. coli</i> K-12.	42
	11	Genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y mutaciones en la región reguladora del gen <i>ampC</i> .	43
	12	Genes de resistencia a quinolonas y mutaciones en las subunidades de GyrA y ParC en las 5 <i>E. coli</i> resistentes a las quinolonas evaluadas.	44
<b>Gráfica 1</b>		Porcentajes de resistencia de las 13 cepas de <i>E. coli</i> hacia los diferentes grupos de antimicrobianos.	41

## Lista de abreviaturas

AMP	Ampicilina
AmpC	$\beta$ -lactamasa derivada de la contracción “ $\beta$ -lactamasa que otorga resistencia a Ampicilina con codificación cromosomal
AMC	Amoxicilina con Ácido Clavulánico
AN	Amikacina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (siglas en inglés)
ATM	Aztreonam
BET	Bromuro de Etidio
BHI	Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón
BLAST	Herramienta básica de búsqueda para alineamientos locales
BLEE	$\beta$ -Lactamasa de Espectro Extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos (siglas en inglés)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CTX	Cefotaxima
CTX-M	$\beta$ -lactamasa derivada de la contracción “Cefotaximasa aislada en Munich”
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMB	Medio de cultivo Eosina Azul de Metileno
<i>et al.,</i>	y colaboradores
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
<i>gyrA</i>	Gen que codifica para la girasa bacteriana
IPM	Imipenem
LIA	Agar Hierro Lisina
MC	Medio de cultivo Mac Conkey

MEM	Meropenem
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
MH	Medio de cultivo Müller Hinton
MIO	Medio de Movilidad Indol Ornitina
mM	Milimolar
MR-VP	Medio de Rojo de Metilo-Voges Proskauer
NA	Ácido Nalidíxico
NaCl	Cloruro de Sodio
NN	Tobramicina
OF	Agar Oxidación/Fermentación Entérica
OMS, WHO	Organización Mundial de la Salud, (siglas en inglés)
OXA	β-lactamasa que otorga resistencia a Oxacilina
<i>parC</i>	Gen que codifica para la topoisomerasa IV
PBP	Proteínas de Unión a Penicilina (siglas en inglés)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial Hidrógeno
<i>qepA</i>	-Gen que codifica para la bomba QepA
<i>qnrA</i>	Gen que codifica para la proteína QnrA
<i>qnrB</i>	Gen que codifica para la proteína QnrB
<i>qnrS</i>	Gen que codifica para la proteína QnrS
rpm	Revoluciones por minuto
S	Estreptomicina
SHV	β-lactamasa derivada de la contracción "Sulfhidril Variable"
SXT	Trimetoprim con Sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TEM	β-lactamasa derivada de la contracción del nombre griego "Temoniera"
TLA-1	β-lactamasa derivada de la contracción del nombre de la cultura "Tlahuica"
TSA	Medio de cultivo Soya Trypticaseína
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar
UFC	Unidad Formadora de Colonia
μg	Microgramo
μL	Microlitro

## RESUMEN

Se muestrearon 71 tortugas (34 hembras y 37 machos) de las especies *Kinosternon integrum* (n = 37), *Trachemys scripta elegans* (n = 30), *Chelydra serpentina* (n = 3) y *Rhinoclemmys* spp. (n = 1), resguardadas en el Herpetario "Coatlicalli" de la Escuela de Biología de la BUAP. Se obtuvo un hisopado cloacal de cada tortuga y se sembró en medio Levine adicionado con CTX (2µg/mL) para aislar bacterias resistentes a CTX (CTX<sup>R</sup>). Se aislaron 13 cepas CTX<sup>R</sup> con características presuntivas de *E. coli* en 11 de las 71 muestras analizadas (15.5%). Estas 13 cepas fueron identificadas como *E. coli* mediante pruebas bioquímicas clásicas y por la amplificación por PCR del gen *uidA*, específico de esta bacteria.

A estas cepas se les realizó el perfil de resistencia hacia 21 antimicrobianos pertenecientes a las familias de β-lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y otros, mediante el método Kirby-Baüer y de acuerdo a los puntos de corte establecidos por CLSI, 2013. También se determinó la producción fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) con la prueba de difusión en doble disco.

Por medio de PCR se buscaron los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (grupos 1 y 9), *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>AmpC</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub> en las cepas que fueron positivas a la prueba fenotípica de producción de BLEE. Los genes detectados fueron (número de aislados): *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (2) *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (2), *bla*<sub>TEM-1</sub> (1); así como mutaciones en diferentes posiciones del promotor-atenuador del gen *bla*<sub>AmpC</sub> en 6 cepas de *E. coli* resistentes a cefoxitina.

A las cepas resistentes a ciprofloxacino se les buscaron genes de resistencia asociados a fluoroquinolonas y mutaciones en los genes cromosomales *gyrA* y *parC*. Se encontraron (aislados) los genes: *aac(6')Ib-cr* (1), *aac(3)-II* (4), *qnrA* (2) y *qnrB* (3); así como las mutaciones S83L, D87N en el gen *gyrA* y S80I, E84A en el gen *gyrB*, respectivamente, en 5 cepas.

A nuestro conocimiento, este es el primer reporte de BLEE en *E. coli* aisladas de tortugas y se propone que las tortugas son reservorios de *E. coli* multirresistentes y productoras de BLEE, por lo que pudieran participar en su diseminación hacia otros hospederos incluyendo al humano.

## I. INTRODUCCIÓN

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo heterogéneo de bacterias gramnegativas, reciben ese nombre por su localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales incluyendo al hombre (Puerta y Mateos, 2010). Son bacilos no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa, carecen de indofenol oxidasa y reducen los nitratos a nitritos. Pueden ser móviles por medio de flagelos peritricos o pueden carecer de estos y ser inmóviles (Valdés-Dapena 2006). La clasificación y nomenclatura de esta familia ha sido muy cambiante, por lo que existen diversas clasificaciones para sus miembros, entre los géneros más frecuentes y con importancia clínica encontramos a *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Shigella*, *Plesiomonas*, *Edwardsiella* y *Ewingella*, entre otros (Puerta y Mateos 2010, Valdés-Dapena 2006).

Entre algunos problemas de salud pública ocasionados por estas bacterias resalta la resistencia a los antibióticos, pues han desarrollado o adquirido mecanismos para hidrolizar o expulsar al antimicrobiano, hecho que refuerza la teoría de Darwin sobre la evolución natural (Cortés 2011). La presión selectiva que se genera con el uso de dosis subterapéuticas de antibióticos contribuye al incremento de bacterias resistentes en humanos según se ha descrito desde 1969 en el *Swann report* (Martí *et al.*, 2006).

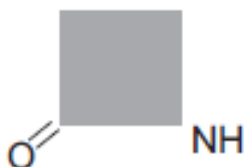
### I.1 Antibióticos $\beta$ -lactámicos

Un grupo de antibióticos ampliamente utilizado en la terapia antimicrobiana es el de los betalactámicos, que tienen acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad. Son relativamente independientes de la concentración plasmática alcanzada, siempre que ésta exceda la concentración mínima inhibitoria (CIM) del agente causal, es decir, la concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano. Algunas modificaciones de la molécula original

han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano, pero la progresiva aparición de resistencia limita su uso y eficacia en determinadas situaciones. Sin embargo, los betalactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica (Suárez y Gudío, 2009).

### I.1.2 Clasificación

La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas.



**Figura 1.** Anillo  $\beta$ -lactámico, estructura principal de los antibióticos betalactámicos (Suárez y Gudío, 2009).

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades.

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo *cefem*, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo betalactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas. Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de las cefalosporinas (Rivas *et al.*, 2002).

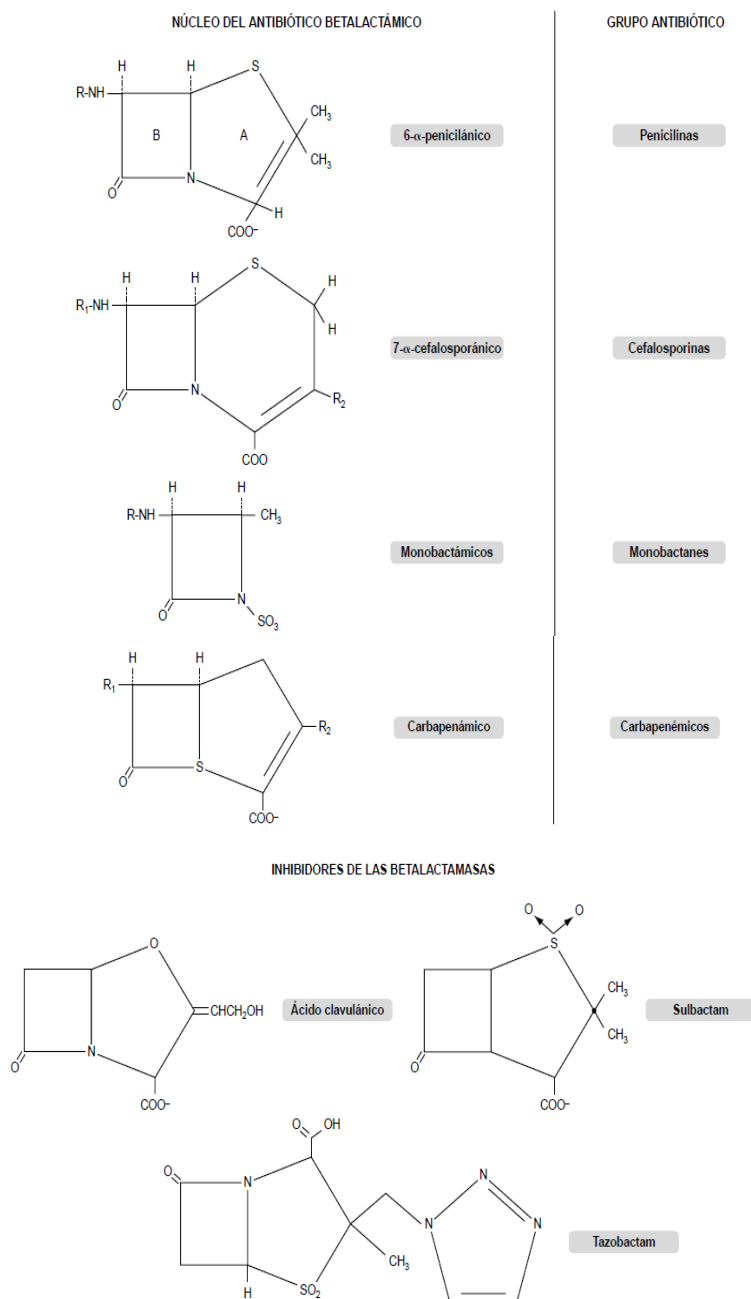
<b>Generación</b>	<b>Parenterales</b>	<b>Orales</b>
<b>Primera</b>	Cefalotina Cefazolina Cefradina Cefapirina	Cefalexina Cefadroxilo Cefradina
<b>Segunda</b>	Cefamandol Cefonicid Cefoxitina Cefuroxime Cefotetan Cefmetazole Ceforanide Ceforinida	Loracarbef Cefaclor Cefuroxime axetil Cefprozil
<b>Tercera</b>	Ceftazidime Cefotaxime Ceftriaxone Ceftizoxime Cefoperazone Moxalactam Cefmenoxime	Cefixime Ceftibuten Cefdinir Cefpodoxima proxetil
<b>Cuarta</b>	Cefepime Cefpirone Cefpiramide Cefozopran E 1100 FK 037 DQ-2556	

Las carbapenémicos son los betalactámicos de más amplio espectro. Sólo carecen de actividad frente a los estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, algunas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y son poco activos frente a *Clostridium difficile*.

Las monobactamas son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla con una estructura monocíclica en

la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario (Marín y Gudiol, 2003).

Los inhibidores de las betalactamasas son moléculas con una afinidad elevada frente a estas betalactamasas, a las que se unen irreversiblemente, evitando así la inactivación del antibiótico betalactámico (Suárez y Gudiol, 2009).



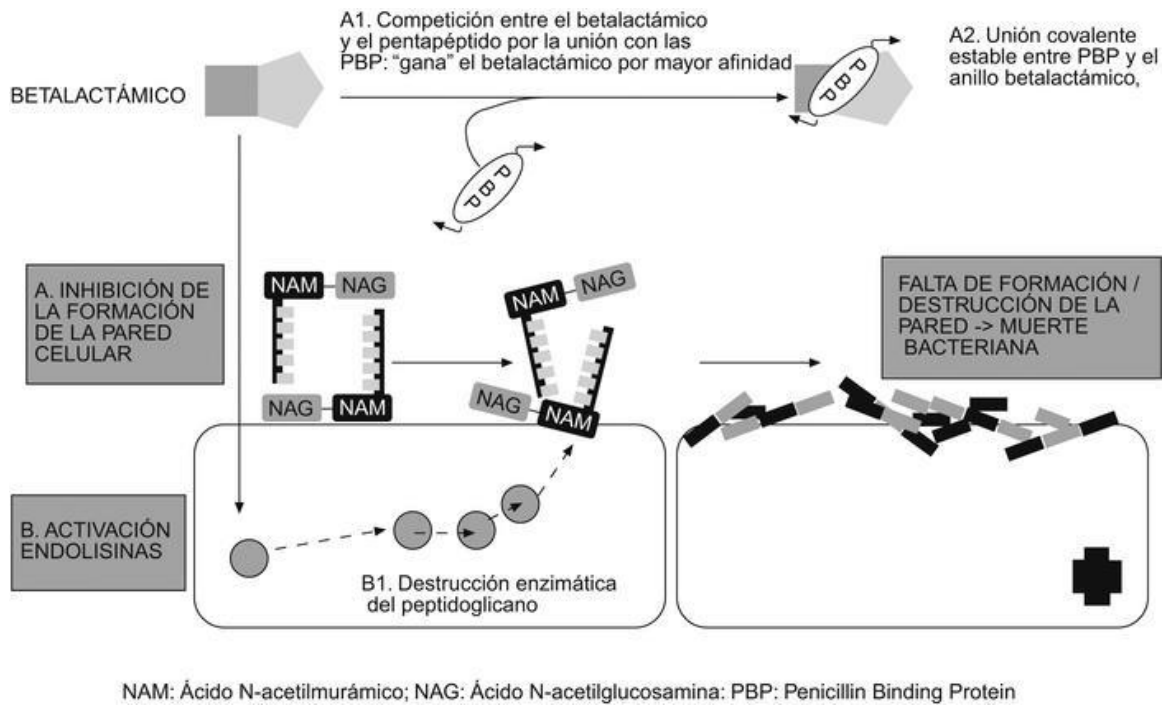
**Figura 2.** Estructura química de los antibióticos betalactámicos e inhibidor de las betalactamasas (ácido clavulánico) (Marín y Gudiol, 2003).

### **I.1.3 Mecanismo de acción**

Los antibióticos betalactámicos producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: 1) inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y 2) inducción de la autólisis bacteriana. En las bacterias grampositivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es el peptidoglucano. Las bacterias gramnegativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas, y de una capa interna delgada de peptidoglucano.

El esqueleto del peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla. Los diferentes componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplásmica al espacio que hay entre ésta y la pared celular (espacio periplásmico), donde se van ensamblando hasta formar la estructura previamente descrita. La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales), para lo que se necesita la acción de unas enzimas que se localizan en ese espacio periplásmico, llamadas de forma genérica transpeptidasas. El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular. Es por eso que estas enzimas se llaman también PBP (penicillin binding protein “proteína ligada a la penicilina”). Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica. Por lo tanto, para que actúen los betalactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que éste es el momento en que se sintetiza la pared celular. Los betalactámicos presentan actividad reducida en situaciones clínicas en las que hay gran parte de la población bacteriana en estado estacionario, como por ejemplo los abscesos.

Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las cepas que carecen de autolisina (generalmente son cepas tolerantes a los betalactámicos) inhiben su crecimiento en presencia del betalactámico, pero no se destruyen completamente (Suárez y Gudío, 2009)



**Figura 3.** Mecanismo de acción de los betalactámicos (Suárez y Gudío, 2009).

### I.1.4 Origen y evolución de BLEE

El principal mecanismo de resistencia hacia los antibióticos betalactámicos es la producción de enzimas betalactamasas (Suárez y Gudío, 2008). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas producidas por las bacterias gramnegativas y les otorga resistencia a las cefalosporinas como la cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona (Hunter *et al.*, 2010), ya que son capaces de inactivar penicilinas, cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos, pero no las cefamicinas o los carbapenémicos. Las BLEE han sido extensamente reportadas en miembros de la familia Enterobacteriaceae desde los años 80 (Piersigilli *et al.*, 2009). Se localizan en

plásmidos y son transferibles entre especies bacterianas (Morales 2003). Sus determinantes genéticos se encuentran generalmente en plásmidos y derivan de otras betalactamasas con menor espectro hidrolítico. Las enzimas también pueden proceder de betalactamasas cromosómicas. La integración de los genes que las codifican en elementos móviles facilita su dispersión y expresión. Las BLEE pueden clasificarse en diferentes grupos o familias según su secuencia de aminoácidos (Cantón R *et al.*, 2007).

### **I.1.5 BLEE**

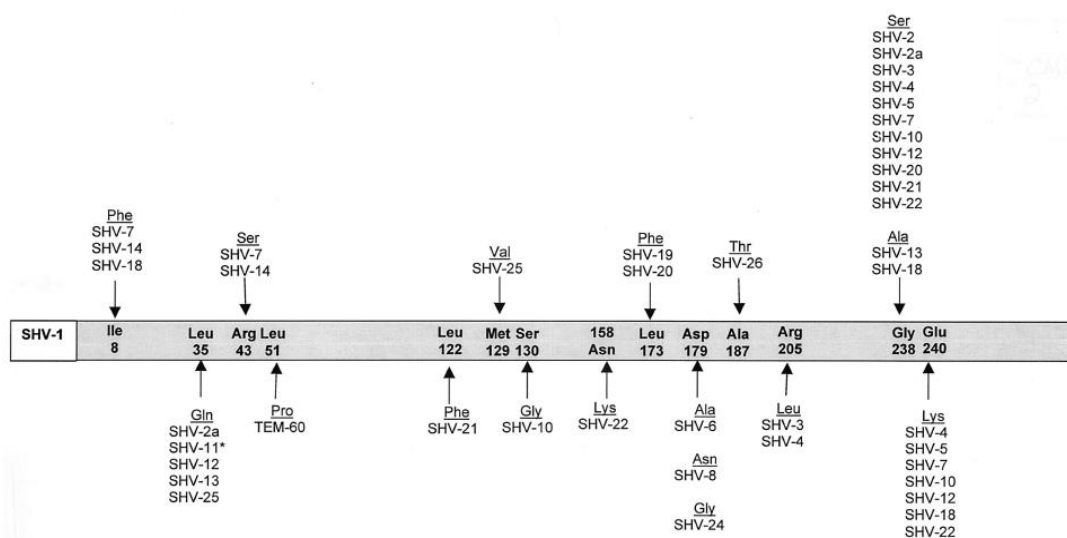
#### **I.1.5.1 Enzimas tipo CTX-M**

En los últimos años se ha reportado una nueva familia de BLEE mediadas por plásmidos llamada CTX-M, perteneciente a la clase A de betalactamasas de amplio espectro. Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar la cefotaxima (de ahí su nombre, aludiendo a la acción cefotaximasa) y Ceftriaxona; sin embargo, se han detectado variantes de CTX-M con mayor actividad ceftazidimasa (Rossolini *et al.*, 2008). Las BLEE tipo CTX-M se han encontrado principalmente en cepas de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y *E. coli*, pero también han sido descritas en otras especies de la familia Enterobacteriaceae (Bradford, 2001). Los genes que codifican a CTX-M han sido capturados a partir del cromosoma de *Kluyvera spp.* en plásmidos conjugativos que median su diseminación entre las Enterobacterias patógenas. (Rossolini *et al.*, 2008). Se ha sugerido que el residuo de serina en la posición 237, que está presente en todas las enzimas CTX-M, juega un papel importante en la actividad de hidrólisis. Las cepas que expresan las betalactamasas tipo CTX-M se han aislado de muchas partes del mundo, pero la mayoría han sido a menudo asociado con brotes focales en el este de Europa, América del Sur, y Japón (Bradford, 2001). Con la excepción de los Estados Unidos, donde han predominado las BLEE tipo SHV y TEM (Lewis *et al.*, 2007)

### I.1.5.2 Enzimas tipo SHV

Las enzimas de tipo SHV (Sulfhidrilo Hidroxil Variable) derivan de la betalactamasa cromosómica de *Klebsiella pneumoniae* SHV-1 (Paterson *et al.*, 2005), son las responsables de resistencia a ampicilina mediada por plásmidos de hasta el 20% (Tzouveleki y Bonomo, 1999). La BLEE SHV-2 fue la primera enzima mediada por plasmidos, descrita en Alemania en 1983 a partir de un aislamiento de *K. ozaenae* capaz de hidrolizar las oxymino-cefalosporinas (ceftazidima, cefpodoxima, ceftriaxona, cefotaxima) y aztreonam (Knothe *et al.*, 1983), la secuenciación mostró que la betalactamasa difería de SHV-1 por la sustitución de glicina por serina en la posición 238 (Paterson *et al.*, 2005). La mayoría de las variantes de SHV que poseen un fenotipo de BLEE se caracterizan por la sustitución de una serina por glicina en la posición 238 (figura 4) (Huletsky *et al.*, 1993). Desde entonces, el gen *bla<sub>SHV</sub>* se ha distribuido ampliamente (Ford y Avison, 2004).

Las BLEE tipo SHV pueden encontrarse con mayor frecuencia en aislados clínicos de *K. pneumoniae*, pero también han sido detectadas en una amplia gama de Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y ahora se han reportado en *Acinetobacter spp.* (Paterson *et al.*, 2005). En cepas de *K. pneumoniae* se ha observado que el gen *bla<sub>SHV-1</sub>* está integrado al cromosoma bacteriano (Livermore, 1995).



**Figura 4.** Sustituciones de aminoácidos en los derivados de la betalactamasa SHV (Bradford, 2001).

### I.1.5.3 Enzimas tipo TEM

Las BLEE tipo TEM son derivados de TEM-1 y TEM-2 por varias combinaciones de sustituciones de aminoácidos (Goussard y Courvalin, 1999), TEM-1 fue reportada por primera vez en 1965 a partir de una *E. coli* aislada de un paciente en Atenas, Grecia, llamado Temoneira (de ahí la denominación TEM). Se diseminó rápidamente a otros miembros de las Enterobacterias y bacterias oxidantes. Esta BLEE comúnmente se encuentra en bacterias gramnegativas, hasta el 90% de resistencia a ampicilina en *E. coli* es debido a la producción de TEM-1 (Levimore, 1995).

Se ha encontrado que un número de derivados de TEM tienen poca afinidad para los inhibidores de betalactamasas, pues poseen actividad hidrolítica insignificante frente a las cefalosporinas de amplio espectro que no se consideran BLEE (Figura 5). Sin embargo, hay mutaciones interesantes en las betalactamasas tipo TEM que además de mantener la capacidad de hidrolizar oxiiimino-cefalosporinas específicas tales como ceftazidima y cefotaxima, muestran resistencia a inhibidores. (Paterson *et al.*, 2005, Bradford, 2001). Las sustituciones de aminoácidos que se producen dentro de la enzima TEM pueden ocurrir en un número limitado de posiciones. Las combinaciones de estos cambios de aminoácidos dan como resultado diversas alteraciones en los fenotipos de BLEE (Bradford, 2001).

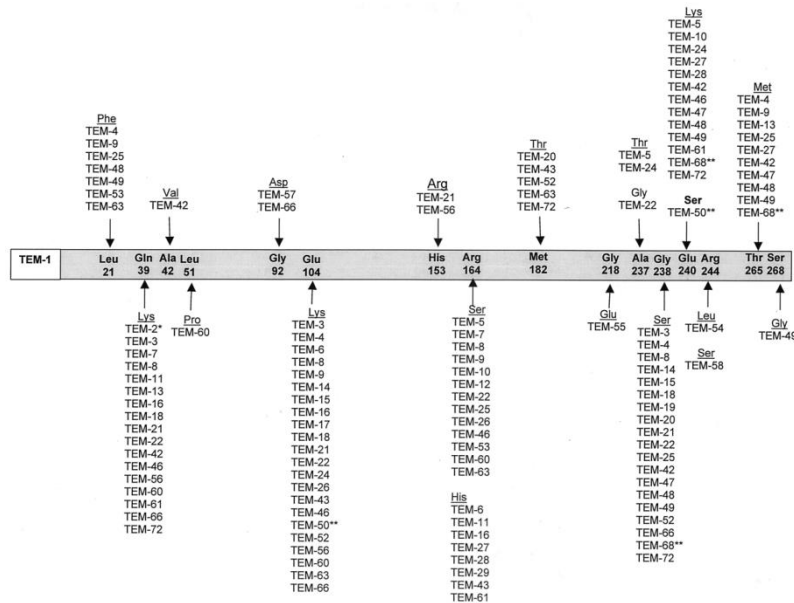


Figura 5. Sustituciones de aminoácidos en los derivados de la betalactamasa TEM (Bradford, 2001).

#### **I.1.5.4 Enzimas tipo OXA**

Las betalactamasas OXA se llaman así debido a su habilidad de hidrolizar oxacilina. Estas enzimas pertenecen a la clase molecular D y grupo funcional 2d, se caracterizan por su tasa de hidrólisis para cloxacilina y oxacilina, 50% mayor que para bencilpenicilina (Bush *et al.*, 1995). Estas betalactamasas se descubrieron originalmente en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de un solo hospital en Ankara, Turquía, por lo que comúnmente se han encontrado en esta bacteria; sin embargo, también se ha detectado en muchas otras bacterias gramnegativas. La mayoría de betalactamasas OXA no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido en un grado significativo, por lo que no son consideradas como BLEE. Sin embargo, OXA-10 hidroliza débilmente cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, dando a la mayoría de los organismos reducción en la susceptibilidad a estos antibióticos (Paterson y Bonomo, 2005). A la fecha se han descrito 21 variantes de esta enzima con perfil de BLEE ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies), 2014).

#### **I.1.6 Diseminación de BLEE**

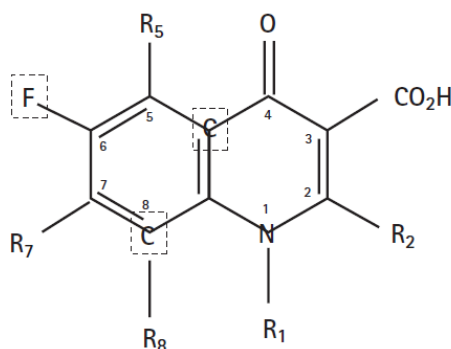
La diseminación de bacterias productoras de BLEE se ha extendido a diversos ecosistemas, debido a muchos factores (Torres y Zarazaga, 2007). Generalmente estas enzimas son detectadas en *E. coli*, sobre todo en pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad, produciéndose un flujo de aislados desde este ambiente al medio hospitalario y vice versa (Cantón., *et al* 2007). Los aislados de *E. coli* productores de BLEE presentan una epidemiología más compleja, con brotes epidémicos causados por clones productores de determinadas BLEE, como CTX-M-15 o diseminaciones clonales asociadas en algunos casos a plásmidos altamente transmisibles (Novais *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2006; Rodríguez-Baño *et al.*, 2006).

Otro factor, que en los últimos años ha tomado especial relevancia en la diseminación de la resistencia bacteriana, es la movilidad de la población, ya que es precisamente por este fenómeno, que genes de resistencia que se han catalogado como propios de ciertas especies bacterianas e incluso de ciertas

áreas geográficas donde las infecciones por estas bacterias son endémicas, se han propagado a nivel mundial (Dongun *et al.*, 2009).

## I.2 Quinolonas

Otro grupo de antibióticos usados ampliamente son las quinolonas, antibacterianos sintéticos de acción bactericida que derivan de una estructura básica, el ácido 4-oxo-1,4 dihidroquinoleína. El nitrógeno en posición 1 y el grupo carboxilo en posición 3 son indispensables para la actividad antibacteriana (Sádaba *et al.*, 1998).



**Figura 6.** Estructura básica de las quinolonas, ácido 4-quinolín-3-carboxílico (Núñez, 2006).

### I.2.1 Clasificación

Las quinolonas se clasifican por generaciones, tomando en cuenta su época de aparición y su espectro antibacteriano.

Las quinolonas de primera generación son activas frente a microorganismos gramnegativos con excepción de *Pseudomonas spp.* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores (Vacarezza, 2000). Las quinolonas de segunda generación son también activas frente a bacterias gramnegativas pero, además, tienen buena actividad contra *Pseudomonas spp.* y algunos microorganismos grampositivos, como *S. aureus*, *S. epidermidis* (incluyendo meticilina resistentes), micobacterias y algunos patógenos atípicos. El ciprofloxacino es el más activo *contra P. aeruginosa*; sin embargo, su actividad frente a *Acinetobacter* y *S. maltophilia* es moderada; mientras que el ofloxacino

es más activo contra *Chlamydia trachomatis* y *Mycobacterium spp*, pero tiene pobre actividad contra bacterias anaerobias; y norfloxacin no es activo contra clamidias, micoplasmas y micobacterias (Davis, 1996). Las de tercera y cuarta generación mantienen buena actividad frente a gramnegativos y micobacterias, pero presentan mejor actividad frente a grampositivos (*Streptococcus pyogenes* y neumococo penicilina sensible y penicilina resistente), anaerobios y patógenos atípicos (Ball, 2001; Dalhoff y Schmitz, 2013). Las de cuarta generación son más activas contra bacterias anaerobias, como *Clostridium* y Bacteroides. Las 8-metoxi quinolonas (moxifloxacin y gatifloxacin) tienen buena actividad contra las enterobacterias y la mayoría de las especies de anaerobios y de cocos grampositivos, incluyendo cepas de *S. pneumoniae* penicilina resistente y *S. aureus* meticilina sensible, pero *S. aureus* meticilina resistente le es habitualmente también resistente, aunque moxifloxacin en algunos casos puede ser activo.

### **I.2.2 Mecanismo de acción**

Las quinolonas penetran en la célula bacteriana por medio de porinas y probablemente por medio de un transportador de membrana donde forman complejos con sus enzimas diana, las topoisomerasas tipo II denominada DNA girasa y topoisomerasa IV. Estas enzimas están implicadas en la replicación y transcripción del DNA, procesos que son bloqueados tras la unión de las quinolonas, ocasionando así la muerte de la bacteria. Las topoisomerasas tipo II son tetrámeros formados por dos subunidades A y dos subunidades B ( $A_2B_2$ ). La DNA girasa está formada por las subunidades GyrA y GyrB, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente; mientras la topoisomerasa IV está codificada por las subunidades ParC y ParE, codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente; estas dos enzimas presentan una gran homología entre ellas, requiriendo ambas ATP para desarrollar su actividad y empleando como sustrato exclusivamente DNA de doble cadena (Hooper, 1999).

### **I.2.3 Resistencia bacteriana a quinolonas**

La resistencia a quinolonas ha provocado un descenso en la efectividad de dichos antibióticos contra determinados microorganismos. Este proceso está relacionado con procesos evolutivos y de selección de resistencia, además del fenómeno de selección, también interviene un proceso de mutagénesis así como la inducción de respuesta SOS. Hasta el momento, se han establecido dos tipos de mecanismos de resistencia a quinolonas: a) mecanismos cromosómicos y b) mecanismos de resistencia mediados por plásmidos. Los mecanismos cromosómicos son originados bien por alteraciones en las enzimas diana de las quinolonas o por una disminución de la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria, hecho que pudiera deberse tanto a una disminución en la permeabilidad de la bacteria, como a una sobreexpresión de bombas de eflujo capaces de expulsar al antibiótico al exterior. El tratarse de mecanismos cromosómicos implica que su transferencia a otros microorganismos es vertical, es decir, se transfiere a las células hijas tras la duplicación del cromosoma bacteriano, de tal manera que la resistencia cromosómica a las quinolonas se puede agrupar en: a) alteraciones en las dianas de acción (mutaciones en la DNA girasa y en la topoisomerasa IV); b) alteraciones de la membrana externa bacteriana que disminuyen o impiden la penetración del antibiótico; y c) la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa.

### **I.2.4 Resistencia plasmídica a quinolonas**

Por otro lado, durante décadas la resistencia bacteriana a estos antibióticos había sido atribuida a mutaciones cromosómicas; sin embargo, en 1998 un grupo de investigadores españoles y americanos, describió por primera vez la resistencia a quinolonas mediada por un plásmido (Martínez-Martínez *et al.*, 1998) El gen responsable de esta resistencia fue denominado *qnr* (de quinolone resistance) y a partir de entonces fueron surgiendo nuevas variantes, así como diferentes mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, tales como la enzima Aac(6')-Ib-cr o la bomba de eflujo QepA (Martínez-Martínez *et al.*, 2008) y más recientemente, las bombas de eflujo OqxA y OqxB (Kim *et al.*, 2009).

#### **I.2.4.1 Proteínas Qnr**

Desde que se descubrió por primera vez el gen *qnr*, han ido apareciendo nuevas variantes del mismo, clasificadas en función de su porcentaje de homología al gen inicial. De este modo, actualmente se han descrito los genes *qnrA* (*qnrA1-qnrA6*), *qnrB* (*qnrB1-qnrB20*), *qnrS* (*qnrS1-qnrS4*) y recientemente, los genes *qnrC* y *qnrD* (Martínez-Martínez et al., 2008). El origen de los genes *qnr* se desconoce, aunque se ha sugerido la posibilidad de que estos genes estuvieran presentes en el cromosoma de algunos organismos de origen humano, veterinario o ambiental, anteriormente al descubrimiento y uso de las quinolonas.

Las proteínas Qnr codificadas por estos genes, pertenecen a la familia de los pentapéptidos repetidos, la cual se define por la repetición en tándem de cinco aminoácidos, según los siguientes motivos semiconservativos: (Ser, Thr, Ala o Val)-(Asp o Asn)-(Leu o Phe)-(Ser, Thr o Arg)-(Gly). Se han descrito múltiples proteínas que presentan estos motivos de repetición de pentapéptidos, pero su función en la mayoría de los casos se desconoce. El mecanismo de acción de las proteínas Qnr se basa en la reducción de la unión entre la DNA girasa y el DNA, para ello la proteína Qnr se une a la DNA girasa en pasos previos a la unión de esta última al DNA. La unión Qnr-DNA girasa es independiente de la presencia de DNA relajado, ATP o quinolonas. Dicha unión provoca una disminución en la unión de la girasa al DNA, reduciendo así las oportunidades de unión de la quinolona a su diana que es el complejo girasa-DNA (Martínez-Martínez et al., 2008).

#### **I.2.4.2 Enzima Aac(6')-Ib-cr**

La actividad de esta enzima fue descrita en el año 2006 tras la detección de aislados clínicos portadores del gen *qnrA1* entre los que se observaban dos poblaciones bacterianas, una de ellas cuatro veces más susceptible a ciprofloxacino que la otra. En la población con menos susceptibilidad se identificó una nueva variante del gen *aac(6')/b*. El gen silvestre codificaba una aminoglucósido acetiltransferasa responsable de la resistencia a los aminoglucósidos kanamicina, amikacina y tobramicina. La nueva variante se

denominó *aac(6')/lb-cr* puesto que confería resistencia a ciprofloxacino además de los aminoglucósidos a los que confería resistencia la variante original (Robicsek et al., 2006). Esta enzima actúa de modo sinérgico con los genes *qnr* multiplicando los niveles de CMI del microorganismo que presenta ambos genes. La variante *aac(6')-lb-cr* difiere de *acc(6')-lb* en dos mutaciones puntuales en la secuencia nucleotídica del gen *aac(6')-lb* que dan lugar a dos cambios aminoacídicos: codón 102 (Trp a Arg ) y codón 179 (Asp a Tyr). La enzima *Aac(6')-lb-cr* actúa modificando su sustrato mediante una reacción de N-acetilación del nitrógeno del grupo amino del sustituyente piperazinil de quinolonas y aminoglucósidos, como consecuencia de este mecanismo de acción, las quinolonas que no poseen el grupo piperazinil, como el ácido nalidíxico, el levofloxacino y el moxifloxacino, no constituyen un sustrato para esta enzima y por lo tanto los niveles de resistencia a ellas no se ven afectados.

El gen *aac(6')-lb-cr* se ha detectado más a menudo en *E. coli* que en *K. pneumoniae*, al contrario de lo que ocurre con los genes *qnr*. La presencia del gen *aac(6')/lb-cr* se ha relacionado con otros genes de resistencia, como *qnr*, pero más frecuentemente con los genes *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>* (resistencia a betalactámicos) y *aac(3)-II* (resistencia a aminoglucósidos) (Boyd et al., 2004; Robicsek et al., 2006).

#### **1.2.4.3 Bomba de eflujo QepA**

La bomba de eflujo QepA fue detectada en una cepa de *E. coli* que presentaba resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y  $\beta$ -lactámicos en Japón en 2007. El gen *qepA* se encontraba en un plásmido que albergaba también los genes *bla<sub>CTX-M-12</sub>*, *mphA* y *rmtB* (Yamane, 2007). En el mismo año también fue detectado en Bélgica en una cepa de *E. coli* resistente a aminoglucósidos que presentaba un plásmido que albergaba los genes *rmtB* y *qepA* (Périchon et al., 2007).

La bomba de eflujo QepA es una proteína de 511 aminoácidos con 14 segmentos transmembranales perteneciente a la familia de proteínas transportadoras MFS (*major facilitator superfamily*). La acción de QepA como

bomba de expulsión genera un efecto moderado de disminución de la sensibilidad a norfloxacin y ciprofloxacino, pero no es capaz de bombear quinolonas menos hidrofílicas como levofloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino, esparfloxacino, entre otras, ni derivados hidrofóbicos como el ácido nalidíxico. La expresión del gen *qepA*, favorece la selección de mutantes e incrementa el nivel de resistencia en presencia de mecanismos adicionales.

En los estudios del entorno genético del gen *qepA*, este se ha encontrado flanqueado por secuencias de inserción IS26 en una región que contenía también los genes *rmtB* (codificante de una aminoglucósido metilasa) y *bla*<sub>TEM-1</sub> o río arriba del gen *intl* (codificante de una integrasa) (Robicsek *et al.*, 2006).

#### **I.2.4.4 Bombas de eflujo OqxA y OqxB**

El compuesto quinoxaline-di-N-oxide olaquinox (OQX) ha sido ampliamente utilizado como promotor de crecimiento en cerdos (Danmap, 1999). Este antibiótico de igual manera actúa inhibiendo la síntesis de DNA. Hasta hace poco no se tenía ningún reporte de resistencia a este antibiótico, pero en 2003, Sorensen *et al.*, describieron la resistencia a OQX mediada por un plásmido conjugativo, pOLA52 de 52 Kb, mismo que también transfirió resistencia a ampicilina y cloranfenicol. La bomba de eflujo OqxAB-TolC fue descrito originalmente en *E. coli* y posteriormente en *K. pneumoniae*. Se identificó un fragmento contiguo de aproximadamente 6 Kb en el que se ubicaron dos ORFs en las posiciones 946 a 2121 y 2145 a 5297 designados como *oqxA* y *oqxB*, respectivamente; *oqxA* codifica para una proteína putativa de 391 aminoácidos, denominada OqxA y *oqxB* para una proteína putativa de 1050 aminoácidos designada como OqxB. Estas bombas muestran alta homología con otras bombas de expulsión como MexE y MexF de *Xanthomonas axonopodis*. La expresión de *oqxA* y *oqxB* fue demostrada por RT-PCR, indicando que estos genes están contenidos en el mismo operón, hecho que era de suponerse porque ambos genes están separados solo por 24 pb. Del mismo modo se han reportado más datos sobre la prevalencia de estas bombas de eflujo en cepas de la familia Enterobacteriaceae, hasta identificar el primer caso en *E. coli* de origen humano (Kim *et al.*, 2009).

### **I.3 Resistencia a aminoglucósidos**

Los aminoglucósidos son antibióticos que tienen actividad antibacteriana contra bacilos gramnegativos aerobios y micobacterias. Su espectro terapéutico es muy amplio, sin embargo, debido a su potencial nefrotóxico se limitó su uso.

Principalmente son tres los mecanismos de resistencia a estos medicamentos: 1) inactivación enzimática de la molécula del aminoglucósido por interferencia en la captura, 2) producción de enzimas que los inactivan: Acetiltransferasa (AAC): acetila el grupo amino; Adeniltransferasa (ANT): adenila el grupo hidroxilo con una nucleotidtransferasa; Fosfolipasa (APH): fosforila el grupo hidróxilo y 3) cambios en los sitios de unión ribosomales en el citosol (Rodríguez-Álvarez, 2002).

### **I.4 Resistencia a Tetraciclinas**

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro que presentan un efecto bacteriostático debido a la asociación reversible entre el antibiótico y el ribosoma. Actúan uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria durante la fase inicial de la síntesis de proteínas; de este modo evitan la unión del aminoacyl-tRNA a su lugar de unión con el ribosoma. Los principales mecanismos de resistencia a tetraciclina son la protección ribosomal y la expulsión activa, el mejor estudiado es la expulsión activa de las tetraciclinas. Los genes *tet* codifican una proteína de membrana citoplasmática (Tet) que actúa como un transportador activo; esta proteína intercambia un protón por un complejo tetraciclina-catión. El proceso de resistencia está dado por dos genes, uno que codifica una bomba de expulsión y otro una proteína represora, ambos regulados por la presencia o ausencia de tetraciclina. En bacterias gramnegativas los genes que comúnmente presentan resistencia a tetraciclina son *tetA-tetE*, *tetG* y *tetH*, mientras que en Enterobacterias los genes *tetA* y *tetB* son los determinantes de la resistencia a tetraciclina. El gen *tetA* junto con el gen *tetR* se han localizado en un transposón de *A. baumannii*, lo que indica la posibilidad de un transferencia horizontal entre microorganismos (Marti *et al.*, 2006).

## II. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mecanismos de resistencia que las bacterias han logrado desarrollar son un problema que se ha presentado tanto en microorganismos grampositivos como gramnegativos. Este fenómeno es cada vez más frecuente en diferentes ambientes como el clínico donde tuvo su origen, en el ambiente y en alimentos. La diseminación de los genes que confieren resistencia a estas bacterias es elevada y por lo tanto alarmante, puesto que posee alta facilidad de propagación en diferentes nichos y pueden originar infecciones que no sean fáciles de tratar.

En los últimos años se ha elevado el número de reportes sobre bacterias patógenas con mecanismos de resistencia, particularmente la producción de BLEE y los genes de resistencia a betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos y carbapenémicos que se codifican en plásmidos de enterobacterias como *E. coli* provenientes de animales, teniendo menos reportes en reptiles, particularmente en tortugas.

Algunos de los estudios realizados a este tema son por ejemplo los de Onderka y Finlayson, quienes en 1985 realizaron la identificación de *Salmonella* en 150 muestras de reptiles, serpientes (51%), lagartos (48%) y tortugas (7%) en el Laboratorio de Servicios Veterinarios en Edmonton, Alberta. Encontrando la presencia de 30 serotipos de *Salmonella*, en serpientes solo 46 (51%) presentaron *Salmonella* y 17% de muertes fueron por Salmonelosis. Algo similar se encontró en lagartos, 22 (48%) resultaron positivas para *Salmonella* y 5 (11%) muertes por infección de *Salmonella*. Sin embargo, la prevalencia de *Salmonella* en las tortugas fue baja, de los 14 examinados, *Salmonella* se detectó en sólo un portador asintomático (Onderka & Finlayson, 1985).

Harwood y cols. en 1999 aislaron coliformes totales de la cloaca y heces de la tortuga acuática *Malaclemys terrapin centrata*. Las siguientes bacterias entéricas se identificaron a partir de muestras fecales y de frotis: *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, y especies de *Salmonella*. *E. coli* fue el aislado más frecuente de coliformes fecales (40,9%),

seguido de *C. freundii* (22,7%), *K. pneumoniae* (18,2%), y *E. cloacae* (13,6%). Un aislado no pudo ser identificado por el sistema API 20E (4,6%). Todos los aislados de *E. coli* presentaron actividad  $\beta$ -glucuronidasa (Harwood *et al.*, 1999).

Santoro y cols. en 2005 llevaron a cabo el estudio bacteriológico de 70 tortugas verdes (*Chelonia mydas*) del Parque Nacional de Tortuguero en Costa Rica, para identificar bacterias aerobias de origen nasal y cloacales. Obtuvieron un total de 325 cepas bacterianas, incluyendo 10 géneros gramnegativos y tres grampositivos. Doscientos treinta y nueve fueron gramnegativas y 86 fueron aislados grampositivos. *K. pneumoniae* fue el microorganismo más común en las muestras: 27/70 (38,5%) en la cloaca, y 33/70 (47,1%) en muestras nasales. La familia Enterobacteriaceae, incluyendo *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *Serratia marcescens*; el grupo más grande fue de bacterias gramnegativas, compuesta por 127 de 239 (53,1%) de los aislamientos. En el grupo de bacterias grampositivas las especies de *Staphylococcus* más prevalentes fueron *S. aureus*, *S. cromogenes*, *S. epidermis*, y *S. intermedius*, con 63 de 86 (73,2%) de los aislamientos grampositivos recuperados (Santoro *et al.*, 2006).

Santoro y cols. en 2006 describieron la flora bacteriana cloacal y nasal de *Lepidochelys olivácea* (Testudines: Cheloniidae) en el pacífico norte de Costa Rica. En el estudio obtuvieron 99 aislamientos bacterianos, incluyendo 10 grupos de gramnegativos y 5 de grampositivos. Del total, 35 bacterias fueron encontradas en la cloaca y 64 en las cavidades nasales. Nueve grupos bacterianos se aislaron en la cloaca y 11 grupos en las cavidades nasales, 5 grupos se encontraron en los dos sitios anatómicos de muestreo. Las bacterias encontradas fueron *Aeromonas spp.*, microorganismo más frecuentemente aislado en la cloaca (13/45), seguido de *Citrobacter freundii* (6/45), *Salmonella spp.* (3/45), *Acinetobacter spp.* (3/45) y *Pseudomonas aeruginosa* (3/45). *Bacillus spp.* fue el más frecuente hallado en las cavidades nasales (32/45), seguido de *Staphylococcus aureus* (6/45), *Corynebacterium spp.* (5/45), *Pseudomonas spp.* (4/45), *Acinetobacter spp.*(4/45), *Proteus mirabilis*,

*Aeromonas* spp. y *Lactobacillus* spp. (3/45). De cada tortuga se obtuvieron un promedio de 0.7 bacterias de la cloaca y 1.4 de las cavidades nasales. En las muestras cloacales predominaron los microorganismos gramnegativos (33/35), mientras que en las primeras vías respiratorias los grampositivos (46/64). *Enterococcus faecalis* fue el único microorganismo grampositivo hallado en la cloaca (Santoro *et al.*, 2006).

Ahmed y cols. en 2007 aislaron 232 bacterias gramnegativas de mamíferos, reptiles y aves alojadas en el Zoológico de Asa, prefectura de Hiroshima, Japón. Obteniendo como la especie más frecuente a *E. coli* (122 aislamientos; 52,6%), seguido por *K. pneumoniae* (17 aislamientos; 7,3%), *Proteus mirabilis* (16 aislamientos; 6,9%), *Enterobacter aerogenes* (14 aislamientos; 6,0%), *Klebsiella oxytoca* (13 aislamientos; 5,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (12 aislamientos; 5,2%), *Enterobacter cloacae* (11 aislamientos; 4,7%), *Proteus vulgaris* (5 aislamientos; 2,2%), *Citrobacter koseri* (5 aislamientos; 2,2%), *Citrobacter freundii* (4 aislamientos; 2,2%), *Morganella morganii* (4 aislamientos; 1,7%), *Salmonella* spp. (3 aislamientos; 1,3%), *Serratia marcescens* (2 aislamientos; 0,9%), y un único aislado (0,43%) de *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas fluorescens*, y *Edwardsiella tarda*. Respecto a los fenotipos de resistencia, 49 aislamientos (21,1%) mostraron resistencia a múltiples fármacos, se identificó el gen *bla*<sub>SHV-36</sub> tipo BLEE en dos aislamientos (0,9%), una *E. coli* aislada de aves y una *E. cloacae* aislada de una tortuga (*Indotestudo elongata*), e integrones de clase 1 y 2, así como los genes de resistencia a quinolonas *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* mediados por plásmidos (Ahmed *et al.*, 2007).

En 2009 Foti y cols. evaluaron la resistencia de bacterias gramnegativas aisladas de tortugas marinas de la especie *Caretta caretta*, hacia 31 antimicrobianos de diferentes familias. Por medio de pruebas bioquímicas convencionales identificaron a las bacterias *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Pantoea* spp., *Pseudomonas* spp. y *Shewanella* spp. Detectaron altos porcentajes de resistencia hacia carbenicilina (100%), cefalotina (92.6%), oxitetraciclina (81.3%) y amoxicilina (77.8%), así mismo los aislados que

mostraron amplio rango de resistencia fueron *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri* y *Pseudomonas aeruginosa*. Este trabajo sugiere que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos refleja el grado de contaminación marina y que *C. caretta* es considerada un bioindicador que puede ser usado para monitorear tal contaminación (Foti *et al.*, 2009).

En 2010 Pachón y cols. en Colombia, en el que obtuvieron 129 muestras ambientales y cloacales de Caimán Llanero (*Crocodylus intermedius*) y Testudines de la Estación de Biología Tropical Roberto Franco en Villavicencio. Encontraron mayor presencia de flora gramnegativa en las muestras cloacales de Testudines: *E. coli* (22%), *Klebsiella sp* (26%), *Salmonella sp.* (7%), *Proteus sp* (4%) y *Citrobacter sp.* (3%), *Enterococcus sp.* (34%). En las muestras cloacales del Caimán Llanero neonato se encontraron algunos microorganismos compartidos con las Testudines, pero con diferentes porcentajes: *E. coli* (30%), *Klebsiella sp* (22%), *Salmonella sp.* (7%), *Proteus sp* (2%), *S. saprophyticus* (4%). *Enterococcus sp.* (19%) (Pachón *et al.*, 2010).

También en 2010 Chen y cols. determinaron la prevalencia de colonización por *Salmonella* en tortugas, serpientes y lagartos en Taiwan, obteniendo una prevalencia del 30.9% entre los 476 reptiles muestreados. La prevalencia de aislamiento fue: serpientes 69.7% (23/33), lagartos 62.8% (27/43) y tortugas 24.3% (97/400). Se identificaron 44 diferentes serovares de *Salmonella*. Aislados de *S. Typhimurium* fueron resistentes a la mayoría de los 12 antimicrobianos evaluados y notablemente, el 61.1% de los aislados fueron resistentes al antibiótico cefalotina. Estos resultados indican que debido a que los reptiles se adoptan cada vez más como mascotas, pueden ser fuente de infecciones causadas por *Salmonella* en humanos, particularmente los serovares zoonóticos como *S. Typhimurium* que presenta resistencia a antimicrobianos (Chen *et al.*, 2010).

Serrano y col, en 2012 identificaron la flora bacteriana en la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) en el ejido Barra Galindo, Tuxpan, Veracruz, México. Tomaron muestras de hembras anidadoras, crías y nidos, de las cuales obtuvieron 14 especies de bacterias (10 gramnegativas y cuatro

grampositivas). Las especies identificadas fueron: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Edwardsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Flavobacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. y *Vibrio liginolyticus*, del total de cepas encontradas, siete se obtuvieron de las muestras oculares, 12 de las muestras cloacales, 11 de los nidos y seis de las crías. Las bacterias más frecuentes en muestras oculares fueron *Salmonella* sp. y *E. coli*, en muestras en cloacas fueron *Citrobacter* sp. y *Flavobacterium* sp., en nidos fueron *Pseudomonas* sp. seguida por *Enterobacter* sp. y en crías fueron *E. coli* y *Salmonella* sp (Serrano *et al.*, 2012).

Whitten y cols. en 2014 evaluaron los casos de salmonelosis en humanos que se han asociado con exposición previa a reptiles de 1996-2011 en Minnesota, USA. La prevalencia de exposición a diferentes reptiles fue la siguiente: lagartos 47%, serpientes 20%, tortugas 19% y combinación de ellos en un 14%. El 84% de los aislados recuperados de pacientes que reportaron contacto previo con reptiles fueron *Salmonella enterica*. Los serotipos más comunes fueron Typhimurium (15%), seguido por Enteritidis (7%) y subespecies IV (7%). También encontraron que aproximadamente el 3.5% de los casos de salmonelosis se presentaron en niños, y se sugieren que los reptiles son fuente de infección para humanos con serotipos no tradicionales de *Salmonella* asociados a reptiles (Whitten *et al.*, 2014).

### III. OBJETIVO GENERAL

Determinar el fenotipo y el genotipo de la resistencia a antibióticos mediada por betalactamasas de Espectro Extendido y quinolonas, en cepas de enterobacterias aisladas de hisopados cloacales de tortugas del Herpetario “Coatlicalli” de la Escuela de Biología de la BUAP.

### IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar cepas de enterobacterias (*Escherichia coli*), aisladas de hisopados cloacales de tortugas del Herpetario “Coatlicalli” de la Escuela de Biología de la BUAP.
2. Determinar el perfil de resistencia a antibacterianos de diferentes familias y caracterizar fenotípicamente la producción de betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE).
3. Identificar genes que codifican para las BLEE tipo CTX-M grupo I y 9, TEM, SHV, AmpC y OXA-1 en los aislamientos mediante PCR y secuenciación.
4. Identificar genes que codifican para resistencia a quinolonas: *parC*, *gyrA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *acc(6')-Ib-cr* y *qepA* en los aislamientos, mediante PCR y secuenciación.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### V.1 Recolección de las muestras para el aislamiento de Enterobacterias (*E. coli*) resistentes a cefotaxima (CTX<sup>R</sup>).

Se realizaron hisopados cloacales a 71 tortugas adultas (1 por animal) de las especies *Kinosternon integrum* (n = 37), *Trachemys scripta elegans* (n = 30), *Chelydra serpentina* (n = 3) y *Rhinoclemmys* spp. (n = 1) resguardadas en el Herpetario "Coatlicalli" de la Escuela de Biología de la BUAP.

Las muestras se recolectaron en medio de transporte Stuart y se conservaron en refrigeración (4 °C) para su procesamiento en un periodo no mayor a 48 horas.

Un hisopado de cada tortuga se sembró por estría cruzada en medio Levine (Difco ®) adicionado con CTX (2µg/mL) y se incubaron a 37 °C por 24 horas para aislar bacterias CTX<sup>R</sup>.

Las cepas con crecimiento positivo en agar Levine/CTX fueron seleccionadas para su resembrado por estría cruzada en agar EMB (Eosina y Azul de Metileno), de igual manera se incubaron a 37 °C por 24 horas y posteriormente se seleccionaron aquellas colonias que presentaron brillo verde metálico, característico de la bacteria *E. coli*.

### V.2 Identificación bacteriana

Las cepas con características presuntivas de la bacteria *E. coli* se resembraron por estría masiva en placas de agar TSA (Bioxon ®), se incubaron por 18 horas a 37 °C, se tomó una colonia y se sembró en placas de agar MacConkey (Bioxon ®) así como en los medios de cultivo que evalúan las pruebas bioquímicas clásicas para Enterobacterias: Agar Hierro Triple Azúcar (TSI Bioxon ®), Agar Hierro Lisina (LIA Bioxon ®), Movilidad Indol Ornitina (MIO MCD LAB ®), Citrato (CIT Dibico ®), Urea de Christensen (URE Bioxon ®), Fenilalanina (FEN Bioxon ®), Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RM-VP Bioxon ®).

Los resultados se compararon con los esquemas de identificación de Cowan y Steel en el manual de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin (MacFaddin, 2003), utilizando la

clasificación taxonómica propuesta en la 2<sup>o</sup> edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner *et al.*, 2005).

Una vez identificadas las bacterias, se resuspendió un cultivo de 24 horas en viales con 1 mL de caldo BHI (Bioxon ®) adicionado con glicerol (Bio-Rad ®) al 10% (vol/vol) y se guardaron a -70 °C para estudios posteriores.

### **V.3 Determinación del perfil de susceptibilidad**

Se realizó la prueba de susceptibilidad a 21 antimicrobianos pertenecientes a las familias de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y otros (Tabla 2), mediante el método Kirby-Baüer (antibiograma) y de acuerdo a los puntos de corte establecidos por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). La bacteria *E. coli* ATCC 25922 fue usada como cepa control.

#### **Procedimiento**

De un cultivo de 18 a 24 horas en agar TSA, se seleccionaron entre 3 y 5 colonias (se eligieron solo colonias bien aisladas para evitar pruebas de cultivo mixto), se recogieron de la placa con un asa bacteriológica y se colocaron en un tubo con 5 mL de solución salina isotónica (SSI) al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, agitando para resuspender el inóculo. Posteriormente se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana con un estándar, de tal manera que se alcanzara un valor de 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Después se impregnó un hisopo de algodón estéril con la suspensión y se inocularon placas de agar Müeller-Hinton (Difco ®) empezando en la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme, de tal manera que el crecimiento fuera en forma de “césped bacteriano”.

Una vez inoculadas las placas se colocaron los sensidiscos impregnados con los antibióticos (Bio-Rad ®), esto se hizo con ayuda de una pinza estéril presionando ligeramente para asegurar el contacto con la superficie, se colocaron 7 discos por placa. Después de 15 minutos de haber colocado los discos, se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C por un lapso de 18 a 24

horas. Finalmente se midieron los halos de inhibición y se compararon con los valores establecidos por el CLSI, 2013 (Tabla 2), con los cuales se determinó si las cepas eran sensibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos. En caso de no haber halo de inhibición, se consideró un valor de 6 mm que corresponde al diámetro del sensidisco y se consideró resistente a ese antibacteriano.

**Tabla 2.** Antibióticos, concentración y diámetro del halo de inhibición (en milímetros) utilizados en la determinación del perfil de resistencia.

<b>Familia</b>	<b>Antibiótico</b>		<b>Concentración (µg)</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>
<b>Betalactámicos</b>	Ampicilina	AMP	10	≤13	14-16	≥17
	Amoxicilina con Ácido Clavulánico	AMC	20/10	≤13	14-17	≥18
	Cefoxitina	FOX	30	≤14	15-17	≥18
	Ceftazidima	CAZ	30	≤17	18-20	≥21
	Cefotaxima	CTX	30	≤22	23-25	≥26
	Cefepime	FEP	30	≤14	15-17	≥18
	Aztreonam	ATM	30	≤17	18-20	≥21
	Imipenem	IPM	10	≤19	20-22	≥23
	Meropenem	MEM	10	≤19	20-22	≥23
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacina	CIP	5	≤15	16-20	≥21
	Ácido Nalidíxico	NA	30	≤13	14-18	≥19
<b>Aminoglucósidos</b>	Estreptomina	S	10	≤11	12-14	≥15
	Gentamicina	GM	10	≤12	13-14	≥15

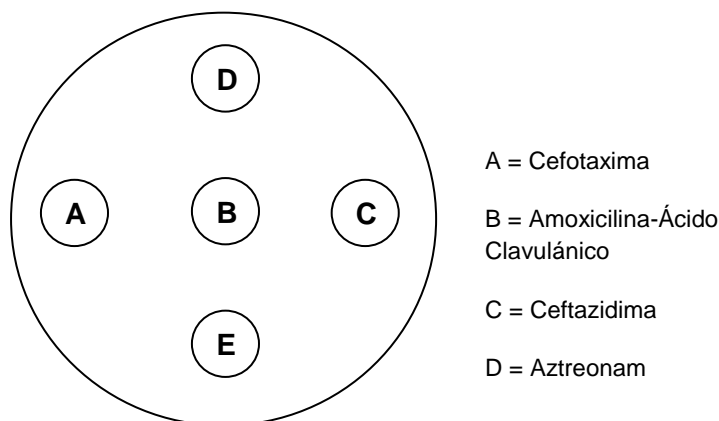
	Amikacina	AN	30	≤14	15-16	≥17
	Tobramicina	NN	10	≤12	13-14	≥15
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina	Te	30	≤11	12-14	≥15
<b>Otros</b>	Trimetoprim con Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16
	Cloranfenicol	C	30	≤12	13-17	≥18

Valores CLSI, 2013.

#### V.4 Producción fenotípica de BLEE

La producción fenotípica de BLEE se realizó mediante la prueba de difusión en doble disco que consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una placa con agar Müller-Hinton (Difco ®) a una distancia de 20 a 25 mm de otros con ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y aztreonam (30 µg) (Jarlier et al., 1988). El procedimiento es el mismo que para un antibiograma, descrito anteriormente.

La ampliación de alguno de los halos de inhibición hacia el disco del centro que contiene el inhibidor (ácido clavulánico), en forma de cola de pescado o de huevo, pone de manifiesto la producción de BLEE. Figura 7.



**Figura 7.** Disposición de los discos en el método de difusión con doble disco.

## V.5 Amplificación de genes codificantes de BLEE

Por medio de PCR se buscaron los genes  $bla_{CTX-M}$  (grupos 1 y 9),  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$ ,  $bla_{AmpC}$  y  $bla_{OXA-1}$  en las cepas que presentaron multirresistencia a los antibióticos betalactámicos y que fueron positivas a la prueba fenotípica de producción de BLEE, para lo cual se emplearon primers específicos para cada uno de los genes. Tabla 3.

**Tabla 3.** Primers utilizados para la amplificación de genes codificantes de BLEE.

Gen	Primer	Secuencia (5' - 3')*	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
$bla_{CTX-M}$	CTXM-UNIVERSAL-F	CGATGTGCAGTACCAGTAA	566	Batchelor <i>et. al.</i> , 2005
	CTXM-UNIVERSAL-R	TTAGTGACCAGAATCAGCGG		
$bla_{CTX-M}$ grupo 1	CTX-M3G-F	GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	1096	Pagani <i>et. al.</i> , 2003
	CTX-M3G-R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC		
$bla_{CTX-M}$ grupo 1	CTX-M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGYC	843	Briñas <i>et. al.</i> , 2005
	CTX-M13D	TTGGTGACGATTTTAGCCGC		
$bla_{CTX-M}$ grupo 2	CTX-M-2-F	ATGATGACTCAGAGCATTCCG	876	Bertrand <i>et. al.</i> , 2006
	CTX-M-2-R	TCAGAAACCGTGGGTTAC		
$bla_{CTX-M}$ grupo 8	CTX-M-8-F	TGATGAGACATCGCGTTAAG	871	Hopkins <i>et. al.</i> , 2006
$bla_{CTX-M}$ grupo 8	CTX-M-8-R	TAACCGTCGGTGACGATTTT		
$bla_{CTX-M}$	CTX-M9-F	GTGACAAAAGAGAGTGCAACGG	857	Coque <i>et. al.</i> , 2002
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC		
$bla_{TEM}$	TEM-F	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	1209	Belaouaj <i>et. al.</i> , 1994
	TEM-R	ACGCTCAGTGGAACGAAAAC		
$bla_{SHV}$	SHV-F	CACTCAAGGATGTATTGTG	883	Pitout <i>et. al.</i> , 1998
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG		

<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	AMPC-CAROFF-1	AATGGGTTTTCTACGGTCTG	192	Caroff <i>et. al.</i> , 1999
	AMPC-CAROFF-2	GGGCAGCAAATGTGGAGCAA		
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	OXA-1	CCAAAGACGTGGATG	442	Briñas <i>et. al.</i> , 2003
	OXA-2	GTAAATTCGACCCCAAGTT		

## V.6 Templado para la amplificación

Extracción por el método de hervido. Esta técnica se basa en la ruptura celular mediante el proceso físico de la ebullición, permitiendo la salida del contenido celular que queda en suspensión.

Procedimiento: Se partió de un cultivo bacteriano puro crecido durante 18 h en agar TSA, posteriormente se colectó una asada bacteriana y se resuspendió en 800 µl de agua inyectable estéril, se agitó con ayuda del vórtex y se colocó durante 10 minutos en un baño con agua hirviendo. Una vez transcurrido el tiempo, se volvió a agitar con vórtex y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se recogió en un tubo eppendorf limpio y estéril. Se midió la concentración de DNA a 260 nm en el Nano drop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific® para asegurarse que la concentración de ADN estuviera entre 200-400 ng/µl. Por otro lado, la pureza del DNA se determinó obteniendo el cociente entre las absorbancias obtenidas a 260 y 280nm. Una preparación pura de DNA daría un cociente entre 1,8 y 2, por lo que si hay contaminación con proteínas u otro componente como fenol, el cociente es menor. Cuando fue necesario se ajustó la concentración con agua inyectable estéril y se guardó a -20°C. Este extracto ADN se usó como templado en las reacciones de PCR.

## V.7 Condiciones para las PCR

Los termocicladores utilizados fueron el T Professional TRIO Thermocycler (Biometra ®).

Las condiciones de reacción empleadas fueron las que se muestran en la tabla 4. En cada PCR se utilizaron dos controles: un control negativo que consistió

de la misma mezcla de reacción pero sin DNA, en su lugar se colocó el volumen correspondiente de agua libre de nucleasas; y como control positivo se utilizó el DNA proveniente del lisado bacteriano de las cepas con el gen de interés ya secuenciado.

**Tabla 4.** Condiciones utilizadas para la amplificación de genes codificantes de BLEE.

Gen	Desnaturalización inicial	Ciclos de amplificación		Extensión final	Conservación final	
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> grupos 2 y 8	94 °C / 5 min.	35 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 30 seg.	72 °C / 5 min.	∞ 4 °C
			Alineamiento	52 °C / 30 seg.		
			Extensión	72 °C / 1 min.		
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> grupo 1	94 °C / 7 min.	35 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 50 seg.	68 °C / 5 min.	∞ 4 °C
			Alineamiento	50 °C / 40 seg.		
			Extensión	68 °C / 1 min.		
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	94 °C / 3 min.	35 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 45 seg.	72 °C / 10 min.	∞ 4 °C
			Alineamiento	62 °C / 45 seg.		
			Extensión	72 °C / 45 seg.		
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	94 °C / 3 min.	30 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 1 min.	72 °C / 5 min.	∞ 4 °C
			Alineamiento	60 °C / 1 min.		
			Extensión	72 °C / 1 min.		
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	96 °C / 15 seg.	24 ciclos	Desnaturalización	96 °C / 15 seg.	72 °C / 3 min.	∞ 4 °C
			Alineamiento	52 °C / 15 seg.		
			Extensión	72 °C / 2 min.		
<i>bla<sub>AmpC</sub></i>	94 °C / 3 min.	30 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 1 min.	72 °C / 10 min.	∞ 4 °C
			Alineamiento	57 °C / 30 seg.		
			Extensión	72 °C / 6 min.		
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	96 °C / 5 min.	35 ciclos	Desnaturalización	96 °C / 1 min.	72 °C /	∞ 4 °C

			Alineamiento	61 °C / 1 min.	10 min.	
			Extensión	72 °C / 2 min.		

**Tabla 5.** Primers utilizados para la amplificación de genes codificantes de resistencia a quinolonas.

Gen	Primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
<b><i>gyrA</i></b>	gyrA-F	TACACCGGTCAACATTGAGG	648	Oram and Fisher, 1991
	gyrA-R	TTAATGATTGCCGCGTCGG		
<b><i>parC</i></b>	ParC-F	AAACCTGTTCAAGCGCCGCATT	395	Vila <i>et al.</i> , 1996
	ParC-R	GTGGTGCCGTTAAGCAAA		
<b><i>qnrA</i></b>	QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	543	Cattoi, <i>r et. al.</i> , 2007
	QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<b><i>qnrB</i></b>	QnrB-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	681	Wang <i>et al.</i> , 2008
	QnrB-R	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA		
<b><i>qnrS</i></b>	QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	654	Cattoi, <i>et. al.</i> , 2007
	RQnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
<b><i>Qep A</i></b>	QepA-F	CGTGTGCTGGAGTTCTTC	403	Cattoi, <i>et. al.</i> , 2008
	QepA-R	CTGCAGGTACTGCGTCATG		
<b><i>Aac(6')-Ib</i></b>	aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	438	Park, <i>et al.</i> , 2006
	aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		

**Tabla 6.** Condiciones utilizadas para la amplificación de genes codificantes de resistencia a quinolonas.

Gen	Primer	Desnaturalización inicial	Ciclos de amplificación		Extensión final	Conservación final	
<b>gyrA</b> <i>E. coli</i>	gyrA-F gyrA-R	92 °C / 3 min.	32 ciclos	Desnaturalización	92 °C / 25 seg.	72 °C / 3 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	64 °C / 1 min.		
				Extensión	74 °C / 2 min.		
<b>parC</b> <i>E. coli</i>	ParC-F ParC-R	94 °C / 3 min.	35 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 1 min.	72 °C / 3 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	55 °C / 1 min.		
				Extensión	72 °C / 1 min.		
<b>qnrA</b>	QnrAm-F QnrAm-R	95 °C / 5 min.	40 ciclos	Desnaturalización	95 °C / 1 min.	72 °C / 7 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	55 °C / 1 min.		
				Extensión	72 °C / 1 min.		
<b>qnrB</b>	QnrB-F QnrB-R	95 °C / 5 min.	35 ciclos	Desnaturalización	95 °C / 1 min.	72 °C / 7 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	56 °C / 1 min.		
				Extensión	72 °C / 1 min.		
<b>qnrB new</b>	QnrB-F-new QnrB-R-new	94 °C / 5 min.	35 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 45 seg.	72 °C / 5 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	53 °C / 45 seg.		
				Extensión	72 °C / 1 min.		
<b>qnrS</b>	QnrSm-F QnrSm-R	95 °C / 5 min.	35 ciclos	Desnaturalización	95 °C / 1 min.	72 °C / 7 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	55 °C / 1		

					min.		
				Extensión	72 °C / 1 min.		
<b>Qep A</b>	QepA-F QepA-R	96 °C / 1 min.	30 ciclos	Desnaturalización	96 °C / 1 min.	72 °C / 5 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	60 °C / 1 min.		
				Extensión	72 °C / 1 min.		
<b>Aac(6')-Ib</b>	aac(6')-Ib-F aac(6')-Ib-R	94 °C / 5 min.	34 ciclos	Desnaturalización	94 °C / 45 seg.	72 °C / 8 min.	∞ 4 °C
				Alineamiento	55 °C / 45 seg.		
				Extensión	72 °C / 45 seg.		

Las PCR's se realizaron utilizando los siguientes componentes en un volumen final de 10 µL. Tabla 7.

**Tabla 7.** Componentes y cantidades empleadas en cada PCR.

Componente (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final
Primer "forward" (Sigma ®)	25 µM	0,5 µL	1.25 µM
Primer "reverse" (Sigma ®)	25 µM	0,5 µL	1.25 µM
TAQ Polimerasa (Fermentans ®)	5 U/µL	0,1 µL	0.05 U/µL
Buffer de reacción (Fermentans ®)	10 X	1,0 µL	1 X
MgCl <sub>2</sub> (Fermentans ®)	25 mM	1,0 µL	2.5 mM
dNTPs mix (Fermentans ®)	10 mM	0,4 µL	0.4 mM
DNA	200-400 ng	1,0 µL	---
Agua	---	5,5 µL	---
Volumen final		10 µL	

## **V.8 Visualización de los productos de PCR**

Los productos de las PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 90 Voltios durante 1 hora junto con un marcador de peso molecular O' Gene Ruler (Fermentans ®), de un rango de 100 a 3000 pb. Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) a una concentración de 0.5 g/L durante 30 segundos y se lavaron en agua destilada por 1 minuto. Para visualizar los fragmentos de DNA, los geles se fotografiaron en el digitalizador de imágenes MiniBis Pro.

## **V.9 Purificación de los productos de PCR**

Los productos de PCR que amplificaron los genes esperados, se purificaron a partir del gel de agarosa con el kit Zemoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Fermantas ®).

## **V.10 Secuenciación de los genes amplificados**

Los genes amplificados se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, México.

## **V.11 Análisis de las secuencias**

Las secuencias recibidas se visualizaron en el programa Finch TV versión 1.4.0 Geospiza (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) y se analizaron con ayuda de herramientas informáticas en la web (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>), BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information Site ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)), donde se compararon con las incluidas en la base de datos del GenBank. Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y la traducción aminoacídica se realizó en <http://molbiol-tools.ca/>.

## RESULTADOS

**Objetivo 1.** Identificación de enterobacterias (*Escherichia coli*), aisladas de hisopados cloacales de tortugas provenientes del Herpetario “Coatlcalli” de la Escuela de Biología de la BUAP.

Se muestrearon 71 tortugas (34 hembras y 37 machos) de las especies *Kinosternon integrum* (n = 37), *Trachemys scripta elegans* (n = 30), *Chelydra serpentina* (n = 3) y *Rhinoclemmys* spp. (n = 1), que en la mayoría de los casos, fueron mascotas previo al resguardo en el herpetario. Tabla 8.

**Tabla 8.** Origen, especie y sexo de las tortugas muestreadas.

Origen	Especie	Sexo		Total
		Hembras	Machos	
Mascotas	<i>Kinosternon integrum</i>	14	23	37
Mascotas	<i>Trachemys scripta elegans</i>	18	12	30
Ambientales	<i>Chelydra serpentina</i>	1	2	3
Mascotas	<i>Rhinoclemmys</i> spp	1	0	1
				<b>71</b>

Se obtuvo un hisopado de cada tortuga y se sembró en medio Levine adicionado con CTX (2µg/mL) para aislar bacterias resistentes a CTX (CTX<sup>R</sup>). Se aislaron 13 cepas CTX<sup>R</sup> con características presuntivas de *E. coli* (figura 8) en 11 de las 71 muestras analizadas (15.5%). Estas 13 cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas clásicas y mediante la amplificación por PCR del gen *uidA*, que codifica para la enzima beta-glucoronidasa. Tabla 9.



**Figura 8.** Crecimiento de *E. coli* en medio Levine con CTX (2µg/mL), colonias verde brillantes.

**Tabla 9.** Identificación de las 13 cepas CTX<sup>R</sup> recuperadas de los hisopados cloacales.

No. muestra	Especie	Sexo	Pruebas bioquímicas									Gen uidA	Bacteria
			Lac	Glu/ Gas	LIA	URE	CIT	FEN	MIO	VP	RM		
2.O	<i>K. i.</i>	M	+	+/-	+	-	-	-	-/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
6.O	<i>K. i.</i>	H	+	+/+	+	-	-	-	+/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
7.T	<i>K. i.</i>	H	+	+/-	+	-	-	-	+/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
8.O	<i>K. i.</i>	H	+	+/-	+	-	-	-	+/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
8.T	<i>K. i.</i>	H	+	+/-	+	-	-	-	+/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
19.O	<i>K. i.</i>	M	+	+/-	+	-	-	-	-/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
24.O.G	<i>K. i.</i>	M	+	+/+	+	-	-	-	-/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
24.R.G	<i>K. i.</i>	M	+	+/-	+	-	-	-	-/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
48.O	<i>T. s. e.</i>	H	+	+/+	+	-	-	-	+/+/+	-	+	+	<i>E. coli (inactiva)</i>
57.N	<i>C. s.</i>	M	+	+/+	+	-	-	-	+/+/+	-	+	+	<i>E. coli (inactiva)</i>
59.N	<i>T. s. e.</i>	M	+	+/+	+	-	-	-	+/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
61.N	<i>T. s. e.</i>	H	+	+/+	+	-	-	-	+/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>
66.M	<i>K. i.</i>	H	+	+/-	+	-	-	-	-/+/-	-	+	+	<i>E. coli</i>

*K. i.*: *Kinosternon integrum*; *T. s. e.*: *Trachemys scripta elegans*; *C. s.*: *Chelydra serpentina*; Lac: lactosa; Glu: glucosa; LIA: agar lisina hierro; URE: ureasa; CIT: citrato; FEN: Fenilalanina; MIO: movilidad, indol, ornitina; VP: Voges Proskauer; RM: rojo de metilo.

De las trece *E. coli* CTX<sup>R</sup>, dos fueron aisladas de la muestra 8 (8.O y 8.T) y otras dos de la muestra 24 (24.O.G y 24.R.G), debido a que en el medio Levine morfológicamente parecían colonias diferentes; sin embargo, al realizar la identificación resultaron ser de la misma especie.

**Objetivo 2.** Determinación del perfil de resistencia a antibacterianos de diferentes familias y caracterización fenotípica de la producción de betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE).

En la tabla 10 se muestra el perfil de resistencia y fenotipo BLEE de las 13 *E. coli* CTX<sup>R</sup> frente a los diferentes antibióticos evaluados. Se detectó una prevalencia del 5.6% de *E. coli* productoras de BLEE entre las 71 tortugas muestreadas (Figura 9).



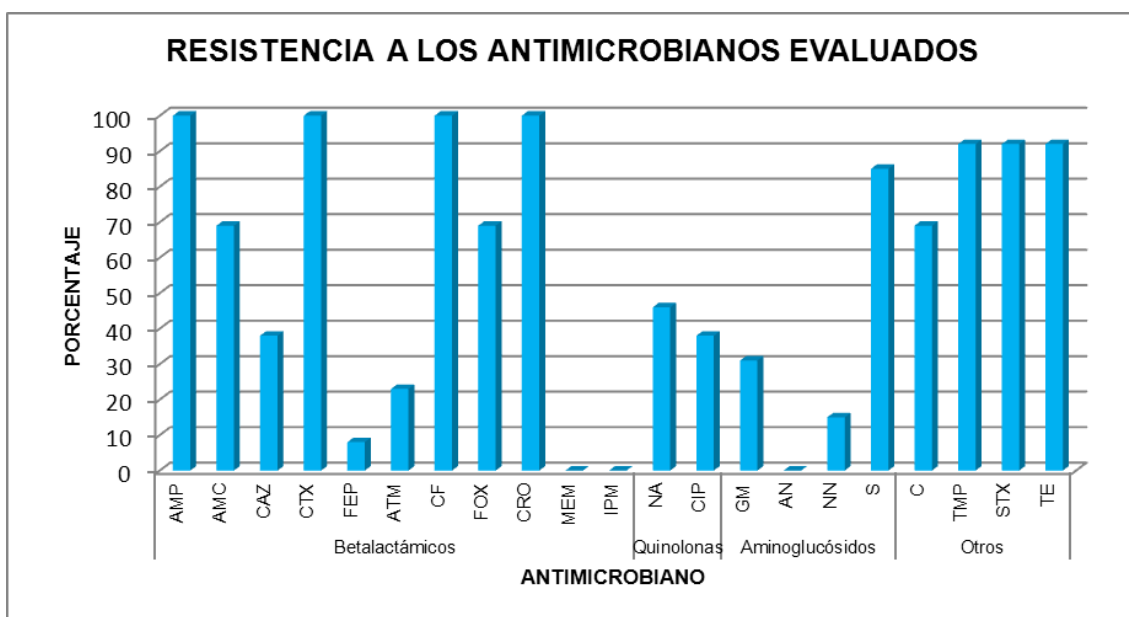
**Figura 9.** Fenotipo BLEE positivo. Prueba de difusión con doble disco; se observa el sinergismo entre 4 antibióticos beta-lactámicos y el disco de amoxicilina/ácido clavulánico en el centro.

**Tabla 10.** Perfil de resistencia y fenotipo BLEE de las 13 *E. coli* CTX<sup>R</sup>.

CEPA	PERFIL DE RESISTENCIA																				FENOTIPO BLEE	
	Betalactámicos										Quinolonas		Aminoglucósidos				Otros					
	AMP	AMC	CAZ	CTX	FEP	ATM	CF	FOX	CRO	MEM	IPM	NA	CIP	GM	AN	NN	S	C	TMP	STX		TE
2	R	S	S	R	I	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	CAZ, CTX, FEP, ATM
6.O	R	I	I	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	
7.T	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	FEP, ATM
8.O	R	R	I	R	S	S	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	R	S	R	R	R	
8.T	R	R	I	R	S	S	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	R	S	R	R	R	
19.O	R	I	R	R	I	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	CTX, FEP, ATM
24O.G	R	R	I	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S	I	R	R	R	R	
24.R.G	R	R	I	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	
48.O	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	
57.N	R	R	R	R	S	S	R	I	R	S	S	R	R	R	S	I	R	S	R	R	R	
59.N	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	
61.N	R	S	I	R	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	CAZ, CTX, FEP, ATM
66.M	R	R	I	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	

I: intermedio; R: resistente; S: sensible; (CLSI, 2013).

Las 13 cepas presentaron resistencia a tres o más clases de antibióticos, por lo que se catalogaron como multirresistentes. Gráfica 1.

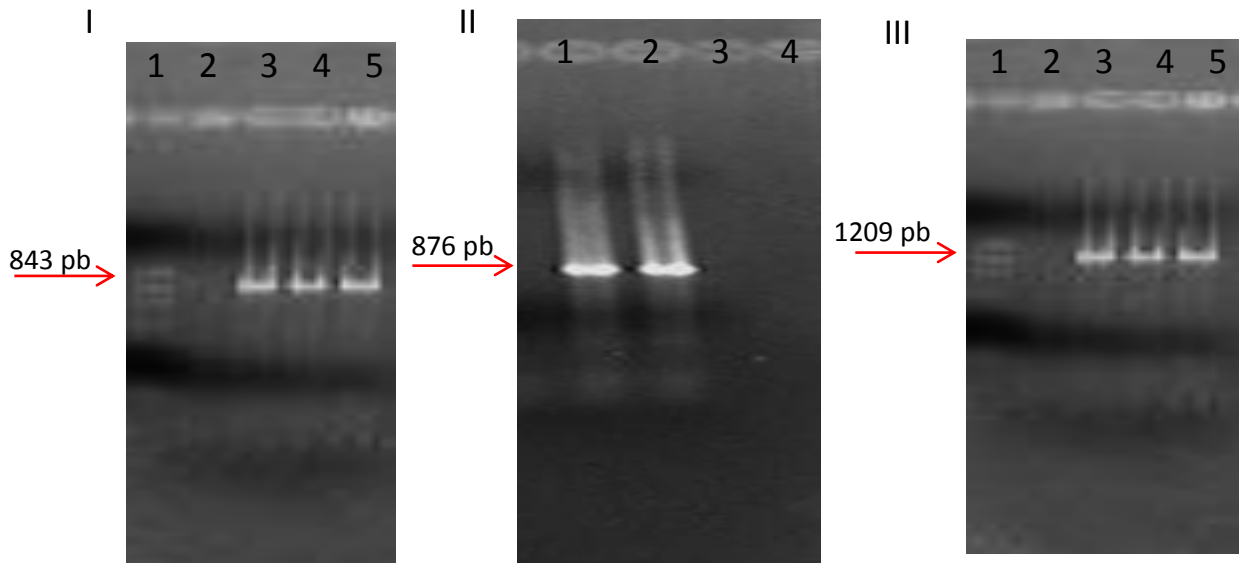


**Gráfica 1.** Porcentajes de resistencia de las 13 cepas de *E. coli* hacia los diferentes grupos de antimicrobianos.

**Objetivo 3.** Identificación de genes que codifican para las BLEE tipo CTX-M grupo 1 y 9, TEM, SHV, AmpC y OXA-1 en los aislamientos mediante PCR y secuenciación.

Cabe señalar que a partir de este objetivo se descartaron 2 cepas que se habían aislado de las mismas muestras (8.O y 24.R.G), ya que de acuerdo al perfil de resistencia parecieron ser la misma bacteria, por lo que genóticamente se estudiaron sólo 11 cepas de *E. coli*.

Se realizó la búsqueda de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> en las 4 *E. coli* con fenotipo BLEE positivo (es decir, que presentaron sinergismo en la prueba de difusión con doble disco), mediante PCR y secuenciación. Figura 10. En la Tabla 11 se concentran los resultados genes identificados.



**Figura 10.** Genes amplificados. **I)** *bla*<sub>CTX-M-15</sub>: Carril 1: Marcador, Carril 2: control -, Carril 3: control + cepa C1550, Carril 4: **cepa 19.O** (4 ml) , Carril 5: **61.N** (4 ml) Tamaño esperado: 843 pb, **II)** *bla*<sub>CTX-M-2</sub>: Carril 1: **cepa 2.O**, Carril 2: **cepa 7.T** ., Carril 3: control -, Carril 4: marcador. Tamaño esperado: 876 pb, **III)** *bla*<sub>TEM</sub>: Carril 1: Marcador, Carril 2: control -, Carril 3: control + cepa 560, Carril 4: control + cepa 569, Carril 5: **cepa 19.O**. Tamaño esperado: 1209 pb.

Por otro lado, a las cepas resistentes a cefoxitina y/o amoxicilina con ácido clavulánico, se les realizó la búsqueda de mutaciones en la región reguladora del gen *ampC*, ya que estos antibióticos inducen la sobre expresión de AmpC debida a la presencia de mutaciones en ciertas posiciones del promotor-atenuador como se muestra en la figura 11. Las mutaciones detectadas en las cepas de estudio mediante secuenciación se muestran en la Tabla 9.

>AmpC\_Eco1iK12

```

5'      -42      -32      -18      -1      +5
      Box -35      Box -10
GCTATCC TGACAGTTGTCA CGCTGATTGGT GTCGT TACAAT CTAACG CATCG CCAATGTAAATCCGG
      +24      +31      +58
CCCG C CTATGG C GGGCCGTTTTTGTATGGAAACCAGACC CTATG
3'

```

**Figura 11.** Región del promotor-atenuador del gen *ampC* de *E. coli* K-12.

**Tabla 11.** Genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y mutaciones en la región reguladora del gen *ampC*.

<i>E. coli</i>	Especie de tortuga (sexo <sup>a</sup> /origen <sup>b</sup> )	Fenotipo BLEE	Resistencia AMC/FOX	Betalactamasas	Mutaciones en <i>AmpC</i>
2.O	<i>K. integrum</i> (M/P)	+	-/-	CTX-M-2	ND <sup>c</sup>
7.T	<i>K. integrum</i> (H/P)	+	+/+	CTX-M-2	Silvestre
61.N	<i>T. scripta elegans</i> (H/P)	+	-/-	CTX-M-15	ND
19.O	<i>K. integrum</i> (M/P)	+	-/-	CTX-M-15, TEM-1	ND
66.M	<i>K. integrum</i> (H/P)	-	+/+		-18, -1, +58
6.O	<i>K. integrum</i> (H/P)	-	-/+		-18, -1, +54, +58
8.T	<i>K. integrum</i> (H/P)	-	+/+		-18, -1, +54, +58
48.O	<i>T. scripta elegans</i> (H/P)	-	+/+		-18, -1, +58
59.N	<i>T. scripta elegans</i> (M/P)	-	+/+		-18, -1, +58
57.N	<i>C. serpentine</i> (M/E)	-	+/-		ND
24.O.G	<i>K. integrum</i> (M/P)	-	+/+		-18, -1, +58

<sup>a</sup>Sexo: H, hembra; M, macho

<sup>b</sup>Origen: (previo al resguardo en el herpetario) P, mascota; E, ambiental

<sup>c</sup>ND: no determinado

**Objetivo 4.** Identificación de genes que codifican para resistencia a quinolonas (*parC*, *gyrA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *acc(6')-Ib-cr* y *qepA*) en los aislamientos mediante PCR y secuenciación.

5 de las 13 cepas presentaron resistencia a ciprofloxacino, por lo que se buscaron genes de resistencia asociados a fluoroquinolonas y mutaciones en los genes cromosomales *gyrA* y *parC*, que se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.** Genes de resistencia cromosómicos y plasmídicos hacia quinolonas en las 5 cepas de *E. coli* resistentes NA y CIP

<i>E. coli</i>	genes de resistencia	Cambios de aminoácidos	
		GyrA	ParC
2.O	<i>qnrA</i> ,	S83L, D87N	S80I
7.T	-	S83L, D87N	S80I
19.O	-	S83L, D87N	S80I, E84A
66.M	<i>qnrB19</i> , <i>OqxB</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i>	S83L, D87H	S80I
57.N	<i>qnrA</i>	S83L, D87N	S80I

NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino.

## DISCUSIÓN

Es de especial relevancia el porcentaje de *E. coli* CTX<sup>R</sup> aisladas de las 71 tortugas muestreadas (15.5%), siendo la especie *Kinosternon integrum* de la que se aislaron con mayor frecuencia, aunque esta también fue la especie predominante entre la población de tortugas. A nuestro conocimiento, no existen trabajos previos que reporten enterobacterias resistentes aisladas de las 4 especies de tortugas que nosotros abordamos y los que existen reportan a otras bacterias como *Salmonella* spp. en otros reptiles (Chen et al., 2010; Whitten et al., 2014) o sugieren que las bacterias resistentes a antibióticos aisladas de otras especies como *Chelonia mydas* y *Caretta caretta*, son un bio-indicador de contaminación en ambientes marinos, hecho que se considera de importancia al ser un problema ecológico (Foti et al., 2009; Al-Bahry et al., 2012).

Las 13 cepas de *E. coli* fueron multirresistentes, de acuerdo a los criterios establecidos por diferentes organismos internacionales, ya que presentaron resistencia a 3 o más grupos de antibióticos (Magiorakos et al., 2011). Aunque la mayoría de los aislados fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, ninguno de ellos presentó resistencia a los carbapenémicos (imipenem y meropenem), que son los que se usan de última elección en la terapia antimicrobiana en humanos, hecho que pudiera excluir la presión selectiva por este grupo de antibióticos en el ambiente.

La presencia de 4 cepas productoras de BLEE en las tortugas muestreadas indica que estos animales fungen como reservorios, lo que puede favorecer la diseminación de estas bacterias hacia otros ambientes. El origen de estas cepas pudiera estar relacionado con la comida que se les da a las tortugas en el herpetario (hígado de pollo, vegetales, tenebrios y croquetas comerciales), ya que hay estudios que reportan la presencia de *E. coli* BLEE positivas en animales destinados al consumo, como es el caso de los pollos (Ben Sallem et al., 2012; Ferreira et al., 2014). Sin embargo, no puede excluirse la posible adquisición de estas cepas multirresistentes antes de que las tortugas fueran resguardadas en el herpetario, es decir, durante el periodo que fueron mascotas o se encontraban en su hábitat natural; así como la participación de algún elemento genético móvil como integrones tipo I, como se demostró en un

estudio paralelo (datos no mostrados) que pueden estar participando en la propagación de la multirresistencia entre especies bacterianas.

Las BLEE CTX-M-2 y CTX-M-15 detectadas en este trabajo, son también las variantes más comúnmente encontradas en aislados clínicos, sobre todo en Latino América (García-Fulgueiras et al., 2011; Sennati et al., 2012; Redondo et al., 2013) y México (Rocha-Gracia et al., 2010; Silva-Sánchez et al., 2013), respectivamente. La variante CTX-M-15 se ha considerado un marcador epidemiológico debido a su alta frecuencia de detección en todo el mundo, sobre todo en *E. coli* y otras enterobacterias de origen clínico; sin embargo, el hecho de encontrar el gen que codifica para esta enzima en 2 cepas aisladas de tortuga pone de manifiesto la alta diseminación que está teniendo esta variante ya no sólo en el ambiente clínico, sino que ya involucra el área veterinaria con otros hospederos, siendo los animales de compañía como perros, gatos y ahora tortugas (como lo sugieren nuestros resultados), los reservorios que más se han reportado (Sun et al., 2010; Wedley et al., 2011; Albrechtova et al., 2012; Harada et al., 2012; Tamang et al., 2012; Sallem et al., 2013; Hordijk et al., 2013; Okubo et al., 2014; Albrechtova et al., 2014; Belas et al., 2014). Estas enzimas se han localizado en elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones o transposones, hecho que facilita su propagación entre distintas especies bacterianas; sin embargo, los mecanismos de resistencia cromosómicos como mutaciones en las posiciones -18, -1, +58 (las comúnmente reportadas) en la región del promotor-atenuador del gen *ampC* de 6 cepas, contribuyen de manera significativa a la multirresistencia en antibióticos beta-lactámicos. Cabe señalar que en 2 de estas 6 cepas se identificó una nueva mutación en la posición +54, que de acuerdo a la literatura, no ha sido relacionada con resistencia a cefoxitona y/o ácido clavulánico.

Cabe mencionar que se detectó el gen *oqxB*, responsable de originar resistencia en la quinolona olaquinox, que se usa como promotor de crecimiento en cerdos siendo este el primer reporte de este gen en una *E. coli* proveniente de tortuga. Sin embargo, no se encontró el gen *oqxA*, que se ha reportado suele estar junto a *oqxB* como un operón, lo que podría indicar que en un origen fueron secuencias independientes y que pudieron unirse por algún elemento móvil (Hansen et al., 2004).

También se encontraron mutaciones en los genes cromosómicos *gyrA* y *parC* que disminuyen la susceptibilidad a quinolonas, donde se identificaron distintas mutaciones, siendo S83L, D87N (en el gen *gyrA*) y S80I (en *parC*) las descritas con mayor frecuencia en *E. coli* provenientes de aislados clínicos en humanos (Ruiz et al., 2012) y que se han descrito por primera vez en *E. coli* aisladas de tortugas en este trabajo. En una cepa se identificó la mutación E84A en el gen *parC*, que no está reportada su relación con la resistencia a quinolonas.

En la diseminación de bacterias multirresistentes desde el animal hacia el humano y viceversa, pueden intervenir varios factores que la favorecen, como el contacto directo entre humano-animal, la manipulación de fomites contaminados y/o las malas prácticas higiénicas en el ambiente de convivencia. En el caso de las tortugas, es común que al fungir como mascotas sean manipuladas físicamente, sobre todos por niños, que al no tener medidas de higiene apropiadas pueden contribuir así a la propagación de estas bacterias, lo que hace a este hecho de suma importancia, ya que la diseminación de esta plataforma genética en cepas de *E. coli* que incluso forman parte de la flora autóctona intestinal hacia diversos nichos ecológicos, incluyendo al humano, pone en predisposición a hospederos susceptibles de adquirir infecciones con pocas alternativas de tratamiento.

## CONCLUSIONES

- ❖ Se aislaron 13 cepas de *E. coli* CTX<sup>R</sup> en 11 de las 71 (15.5%) tortugas estudiadas.
- ❖ Las *E. coli* provenientes de tortugas fueron resistentes a la mayoría de los antibióticos evaluados: AMP, CTX, CF y CRO (100%); TMP, STX y TE (92%); S (85%); AMC, FOX y C (69%); NA (46%); CAZ, CIP (38%); excepto a los carbapenémicos.
- ❖ Es de importancia epidemiológica la presencia de CTX-M-15 (variante endémica) y CTX-M-2 (asociada con el continente americano) en las *E. coli* abordadas en este trabajo.
- ❖ A nuestro conocimiento, este es el primer reporte de BLEE y mutaciones en AmpC (-18, -1, +54, +58) en *E. coli* aisladas de tortugas.
- ❖ Las tortugas son reservorios de *E. coli* multirresistentes y productoras de BLEE, por lo que pudieran participar en su diseminación hacia otros hospederos incluyendo al humano.

## PERSPECTIVAS

- ✓ Estudiar el genotipo de resistencia hacia otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclina y sulfonamidas.
- ✓ Determinar la presencia de beta-lactamasas tipo AmpC, como CMY-2 u otras variantes.
- ✓ Estudiar la presencia de integrones de clase 1 y clase 2 en todas las cepas y determinar la localización y estructura de genes cassette.
- ✓ Determinar el grupo filogenético y la secuencia tipo (ST) de las cepas mediante MLST.
- ✓ Determinar y caracterizar la presencia de plásmidos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed A. M., Motoi Y., Sato M., Maruyama A., Watanabe H., Fukumoto Y., Shimamoto T. 2007. Zoo Animals as Reservoirs of Gram-Negative Bacteria Harboring Integrons and Antimicrobial Resistance Genes. *Applied and Environmental Microbiology*; 73( 20): 6686–90.
- Al-Bahry SN, Al-Zadjali MA, Mahmoud IY, Elshafie AE. 2012. Biomonitoring marine habitats in reference to antibiotic resistant bacteria and ampicillin resistance determinants from oviductal fluid of the nesting green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Chemosphere*;87:1308-1315.
- Albrechtova, K., Dolejska, M., Cizek, A., Tausova, D., Klimes, J., Bebora, L., Literak, I., 2012. Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 4013-4017.
- Albrechtova, K., Kubelova, M., Mazancova, J., Dolejska, M., Literak, I., Cizek, A., 2014. High prevalence and variability of CTX-M-15-producing and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* observed in stray dogs in rural Angola. *Microbial Drug Resistance* 20, 372-375.
- Ball, P. 2001. Future of the quinolones. *Semin Respir Infect*; 16(3):215-24.
- Belas, A., Salazar, A.S., Gama, L.T., Couto, N., Pomba, C., 2014. Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in dogs. *The Veterinary Record* doi: 10.1136/vr.101978.
- Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Jouini, A., Gharsa, H., Klibi, N., Boudabous, A., Torres, C., 2012. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and

CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathogenes and Disease* 9, 1137-1142.

Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGree A, Muller MP, Willey BM, Bryce E, Gardam M, Nordmann P, Mulvey MR. 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(10):3758-3764.

Bradford PA. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 14: 933-51.

Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39:1211–1233.

Cantón R., Valverde A., Novais A., Baquero F y Coque T. 2007. Evolución y panorama actual de las BLEE. *Infecciones por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): un desafío epidemiológico y terapéutico*. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*; 25(2): 2-10.

Chen CY, Chen WC, Chin SC, Lai YH, et al. 2010. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonellae* isolates from reptiles in Taiwan. *J Vet Diagn Invest*; 22:44-50.

Clinical Laboratory Standards Institute, 2013.

Cortés J. A. 2011. Resistencia en enterobacterias: evolución, enzimas y ambiente. *Infecciones*; 15(3): 145-146.

- Dalhoff, A. y Schmitz, FJ. 2003. In vitro antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 22(4):203-21.
- Danmap. 1999. Resistance monitoring in Denmark, 1997–DANMAP. *Wkly Epidemiol. Rec*; 74:125–127.
- Davis, R., Markham, A., Balfour, JA. 1996. Ciprofloxacion. An updated review review of its pharmacology therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs*. 51 (6):1019-74. Review.
- Dongun, Y., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R. 2009. Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, *bla<sub>NDM-1</sub>*, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemother*. 53:5046-5054.
- Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri A Junior, et al. 2014. Detection of chromosomal *bla<sub>CTX-M-2</sub>* in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. *Clin Microbiol Infect*; doi: 10.1111/1469-0691.12531.
- Foti M, Giacobello C, Bottari T, Fisichella V, et al. Antibiotic resistance of gram negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 2009;58:1363-1366.
- Ford, P., and Avison, MB., 2004. Evolutionary mapping of the SHV  $\beta$ -lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla<sub>SHV</sub>* mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2004) 54, 69–75.
- García-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, et al. 2011. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in

- enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother*; 66:1725-1729.
- Goussard, S. y Courvalin, P. 1999. Updated Sequence Information for TEM  $\beta$ -Lactamase Genes. *Antimicrob. Agents Chemother*; 43(2):367.
- Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, et al. 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:3332-3337.
- Harada, K., Nakai, Y., Kataoka, Y., 2012. Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27  $\beta$ -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan. *Microbiology and Immunology* 56, 480-485.
- Hooper, D. C. 1998. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and antitopoisomerase resistance. *Clin.Infect.Dis.* 27 Suppl 1:S54-S63.
- Hordijk, J., Schoormans, A., Kwakernaak, M., Duim, B., Broens, E., Dierikx, C., Mevius, D., Wagenaar, J.A., 2013. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Frontiers in Microbiology* 4, 1-5.
- Harwood, V., Butler, J., Parrish, D. y Wagner, V. 1999. Isolation of Fecal Coliform Bacteria from the Diamondback Terrapin (*Malaclemys terrapin centrata*). *Applied and environmental microbiology*; 65(2):865-867.
- Hunter P. A., Dawson S., French G.F., Goossens H., Hawkey P. M., Kuijper E.J., Nathwani D., Taylor D. J., Teale C. J., Warren R. E., Wilcox M. H., Woodford N., Wulf M. W., y Piddock L. J. V. 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *Journal Antimicrob Chemother*; 65(1): 3–17.

- Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G. and Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer B-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10: 867-878.
- Kim H. B., Wang M., Park C. H., Kim E. C., Jacoby G. A. y Hooper D. C. 2009. oqxAB Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 53(8): 3582–3584.
- Knothe H, Shah V, Kremery M, Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*; 11: 315-7.
- Lewis, James S., Herrera, Monica., Wickes, Brian., Patterson, Jan E., y Jorgensen, James H. 2007. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System.
- Livermore D.M. 1995.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557–84.
- MacFaddin, J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana.
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Hindler, J. F. 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Microbiol Infect* ; 18: 268–281.
- Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21: 42-55.

- Martí S., Fernández-Cuenca F., Pascual A., Ribera A., Rodríguez-Baño J., Bou G., Cisneros J. M., Pachón J., Martínez-Martínez L., Vila J., Grupo de estudio de Infección Hospitalaria. 2006. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica; 24 (2): 77-80.
- Martínez-Martínez, L., S. Hernández-Allés, S. Albertí, J. Tomás, V. Benedi, and G. Jacoby. 1998. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 40:342–348.
- Morales I. R. 2003. Terapia de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Revista Chilena de Infectología; 20 (1): 24-27.
- Novais, A., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galán, JC., Peixe, L., Carattoli, A., Baquero, F., Coque, TM. 2006. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in 158 early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. Antimicrob Agents Chemother. 50: 2741-50.
- Núñez, A., Morales, C., Rivera, M., González, A. 2006. Nuevos Betalactámicos. Medicrit; 3(6): 132-13
- Okubo, T., Sato, T., Yokota, S., Usui, M., Tamura, Y., 2014. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. Journal of Infection and Chemotherapy 20, 243-249.
- Onderka DK, Finlayson MC. 1985. Salmonellae and salmonellosis in captive reptiles. Can J Comp Med 1985; 49: 268-270.
- Pachón D. A., Pulido A. P., Moreno C. 2010. Isolation and identification of enteric microorganisms in environmental and cloacae samples of

*Crocodylus intermedius* and Testudines in the Estacion de Biologia Tropical Roberto Franco, Villavicencio, Colombia. Rev. Med. Vet. Zoot. 57: 23-34.

Paterson D y Bonomo R. 2005. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: A clinical Up-date. Clin Microbiol Rev; 18: 657-686.

Peña, C., Gudiol, C., Tubau, F., Saballs, M., Pujol, M., Dominguez, MA., Calatayud, L., Ariza, J., Gudiol, F. 2006. Riskfactors for acquisition of extended-spectrum betaBibliografía 160 lactamase-producing *Escherichia coli* among hospitalized patients. Clin Microbiol Infect. 12: 279-84.

Périchon B, Courvalin P, and Galimand M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by metilation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 51:2464-2469.

Piersigilli A. L., Enrico M. C., Bongiovanni M. E., Bilbao L. E., Martínez G. y Ledesma E. M. 2009. Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido en un centro privado de Córdoba. Revista Chilena de Infectología; 26 (4): 331-335.

Puerta-García A. y Mateos-Rodríguez F. 2010. Enterobacterias. Medicine; 10 (51): 3426-31. Albacete, España.

Redondo C, Chalbaud A, Alonso G. 2013. Frequency and diversity of CTX-M enzymes among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from Caracas, Venezuela. Microb Drug Resist;19:42-47.

Rivas, K.B., Rivas, M.A., Dávila, E.L y Rodríguez, M. 2002. Cefalosporinas. De la primera a la cuarta generación. Revista de la Facultad de Medicina Caracas; 25 (2).

- Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper, D.C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 6:629-40.
- Rocha-Gracia R, Ruiz E, Romero-Romero S, Lozano-Zarain, P, et al. 2010. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *J Antimicrob Chemother*; 65:169-171.
- Rodríguez-Baño, J., Navarro, MD., Romero, L., Muniain, MA., Perea, EJ., Pérez-Cano, R., Hernández, JR., Pascual, A. 2006. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis.* 42: 37-45.
- Rossolini GM., D'Andrea. MM., Mugnaioli. C. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum betalactamases. *Clin Microbiol Infect.* 14 (Supl 1): 33-41.
- Ruiz, E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., Torres, C., 2012. *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 886-897.
- Sádaba, B., Escolar, M., Azanza, J.R., García, E. 1998. Quinolonas *Medicina*; 7(72): 3344-3353.
- Sallem, R. B., Gharsa, H., Slama, K. B., Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Porres-Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., Sáenz, Y., Boudabous, A., et al., 2013. First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 13, 98-102.

- Santoro, M., Orrego, C.M., Hernández-Gómez G. 2006 Cloacal and nasal bacterial flora of *Lepidochelys olivacea* (Testudines: Cheloniidae) from the North Pacific coast of Costa Rica. . Rev. Biol. Trop; 54 (1): 43-48.
- Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, et al. 2012. Changing epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. Antimicrob Agents Chemother; 56:6003-6005.
- Serrano, A., Vázquez-Castán, L., Sánchez Silva, C., Basañez-Muñoz, A., Naval-Ávila, C. 2012. Identificación de la flora bacteriana en la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) en el ejido Barra Galindo, Tuxpan, Veracruz, México. *Hidrobiológica* [online]; 22(2): 142-146.
- Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, et al. 2013. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. PLoS One; 8:1-10.
- Sun, Y., Zeng, Z., Chen, S., Ma, J., He, L., Liu, Y., Deng, Y., Lei, T., Zhao, J., Liu, J.H., 2010. High prevalence of *bla*<sub>(CTX-M)</sub> extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 1475-1481.
- Suárez, C. y Gudiol, F. 2009. Beta-lactam Antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 27 (2):116–129.
- Tamang MD, Nam HM, Jang GC, Kim SR, et al. 2012. Molecular characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother*; 56:2705-2712.

- Torres C y Zarazaga M. 2007. BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. Infecciones por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): un desafío epidemiológico y terapéutico. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*; 25(2): 29-37.
- Tzouvelekis, L. S., and R. A. Bonomo. 1999. SHV-type  $\beta$ -lactamases. *Curr. Pharm. Des.* 5:847–864.
- Vacarezza, M. 2000. Quinolonas. Disponible en: <http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/quino/framec.html>
- Valdés-Dapena Vivanco M. M. 2006. Enterobacterias. *Microbiología y parasitología médicas*. Capítulo 26.
- Wedley, A.L., Maddox, T.W., Westgarth, C., Coyne, K.P., Pinchbeck, G.L., Williams, N.J. Dawson, S., 2011. Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs in a cross-sectional, community-based study. *The Veterinary Record* 168, 354.
- Whitten T, Bender JB, Smith K, Leano F, et al. 2014. Reptile-associated salmonellosis in Minnesota, 1996-2011. *Zoonoses Public Health*; doi: 10.1111/zph.12140.
- [www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies), 2014