

**Universidad de Costa Rica  
Facultad de Microbiología**

**Determinación de la concentración inhibitoria mínima a diversos antibióticos y la presencia de integrones clase I en cepas de *Escherichia coli* y *Serratia marcescens* aisladas a partir de monos *Alouatta palliata* de Costa Rica**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en  
Microbiología y Química Clínica**

**Realizado por:**

**Ana Lucía Ugalde Muñoz**

**Tutor: Dr. Fernando García Santamaría**

**Lectores:**

**Dr. César Rodríguez  
Dra. María del Mar Gamboa**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
Mayo, 2007**

## **DEDICATORIA**

**A mis papás que me han apoyado siempre y me dieron la oportunidad de salir adelante**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme llegar a esta etapa de mi vida, por darme la salud y las fuerzas para salir adelante

A mis papás por darme la oportunidad de estudiar y apoyarme en todo lo que necesité

A mi tutor Fernando García por toda su ayuda, su tiempo y sus consejos

A Marco por su paciencia y apoyo incondicional

A todos los compañeros del laboratorio de Bacteriología por su colabora

### ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

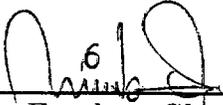
### ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 9.5

### ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de **Licenciada en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctora en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que sera oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las 12:20 horas.

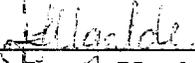
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Esteban Chaves  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando García

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Cesar Rodríguez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María del Mar Gamboa

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Caterina Guzmán

  
\_\_\_\_\_  
Ana Lucía Ugalde Muñoz  
Postulante

**Tabla de Contenidos**

<b>Índice de cuadros</b>	<b>v</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>vi</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Justificación</b>	<b>8</b>
<b>Objetivos</b>	<b>9</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>10</b>
<b>Resultados</b>	<b>14</b>
<b>Discusión</b>	<b>22</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>27</b>

**Índice de Cuadros**

<b>Cuadro 1</b>	<b>12</b>
<b>Cuadro 2</b>	<b>12</b>
<b>Cuadro 3</b>	<b>14</b>
<b>Cuadro 4</b>	<b>15</b>
<b>Cuadro 5</b>	<b>17</b>
<b>Cuadro 6</b>	<b>18</b>

**Índice de Figuras**

<b>Figura 1</b>	<b>13</b>
<b>Figura 2</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3</b>	<b>20</b>
<b>Figura 4</b>	<b>21</b>

## RESUMEN

Ciertas especies bacterianas han conseguido adaptarse a los antibióticos, en donde la resistencia confiere una capacidad adaptativa. En ocasiones la resistencia no sólo es transmitida a sus descendientes, sino también a otras bacterias de la misma o de distinta especie. La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y/o por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. En el primer caso, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético móvil tales como integrones y transposones. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos. En este estudio se analizaron 74 cepas de *Escherichia coli* y 20 cepas de *Serratia marcescens* aisladas a partir de monos *Alouatta palliata* de Costa Rica. Para cada una de las cepas se determinó la concentración inhibitoria mínima de la amoxicilina, amoxicilina- ácido clavulánico, cefalotina, cefuroxima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, tetraciclina, trimetoprim y sulfametoxazol. A partir de dichos resultados se calculó la CIM 90 y la CIM 50 para cada uno de los antibióticos. Además dichas cepas se analizaron para buscar la presencia de integrones clase I. En las cepas de *E. coli* se pudo observar una resistencia importante a cefalotina (16.2%), tetraciclina (75.7%) y sulfametoxazol (23%). En el caso de *S. marcescens* se observó una resistencia importante para amoxicilina (80%), amoxicilina- ácido clavulánico (75%), cefalotina (100%), cefuroxima (75%) y tetraciclina (100%). Al comparar ambas especies se pudo observar que las cepas de *S. marcescens* presentan porcentajes de resistencias mayores en comparación con las cepas de *E. coli*. Sólo la cepa de *E. coli* UCR 867 fue positiva por la presencia de integrones clase I. Este estudio demuestra que la resistencia a antimicrobianos está presente en las cepas de *E. coli* y *S. marcescens* aisladas de monos *Alouatta palliata* en Costa Rica. Partiendo del hecho que dicha población no se encuentra en contacto directo con antimicrobianos es cuestionable cómo estas bacterias han adquirido genes de resistencia. Aunque si bien, en aquellos casos donde el nivel de la CIM es muy alto probablemente se deba a genes adquiridos horizontalmente, aunque también no se puede olvidar el hecho de que algunas bacterias muestran ya de por sí una resistencia intrínseca a algunos antimicrobianos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias y hongos), que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos. Se han identificado cientos de antibióticos y muchos han sido llevados a la etapa en la que tienen utilidad en la terapéutica de las enfermedades infecciosas (Hardman *et al* 1996).

La búsqueda de los antibióticos la inició Paul Erlich, químico alemán, quien propuso en la década de 1890 la idea de la “bala mágica”, sustancias químicas que unían e inhibían microorganismos en forma específica, sin causar daño en el hospedero. El descubrimiento del Salvarsan por parte de Ehrlich y Hata en 1909 para el tratamiento de la sífilis y el hallazgo en 1932, por parte de Domagk, de que el Protonsil (sulfonamida) era eficaz en el tratamiento de la fiebre puerperal marcaron el nacimiento de la quimioterapia antimicrobiana (García 2005). La “época de oro” de los antibióticos comenzó con la penicilina. Se le atribuye a Alexander Fleming el descubrimiento de la penicilina en 1928, sin embargo fue hasta 1941, cuando se produjo en forma cruda dicho compuesto y se le pudo obtener para estudios limitados en seres humanos (García 2005). Durante las décadas de 1940, 1950 y 1960 se descubrieron y desarrollaron gran cantidad de diversos antibióticos, principalmente de bacterias cultivadas a partir de suelos. Al menos 30% de los sujetos hospitalizados en la actualidad recibe uno o más ciclos de de antibioticoterapia, y los compuestos de esa categoría han curado millones de infecciones que pudieron haber sido letales (Hardman *et al* 1996).

Desde su descubrimiento se ha comercializado y empleado una gran cantidad de antibióticos. Su uso y abuso ha provocado un desafío a las bacterias que tenían contacto con estos medicamentos. Ya para el año 1944, apenas unos años después de iniciar el uso clínico de la penicilina, se reporta el primer fracaso de este antibiótico en tratamiento de una infección por una cepa de *Staphylococcus aureus* capaz de sintetizar una penicilinasas, una enzima que destruye la penicilina (García 2005). Hay que tener en cuenta que en nuestro organismo tenemos más células bacterianas que células eucariotas y que los tratamientos antibióticos no sólo afectan a las bacterias patógenas, sino también a las comensales. Ciertas especies bacterianas han conseguido adaptarse a los antibióticos

mediante mutaciones, o bien mediante la selección progresiva de los clones resistentes, en donde la resistencia confiere una capacidad adaptativa. En ocasiones la resistencia no sólo es transmitida a sus descendientes, sino también a otras bacterias de la misma o de distinta especie (Alos & Carnicero 1996)

Sin embargo, en el ambiente se da una selección de genes de resistencia a antibióticos que no ocurre necesariamente por la exposición a los mismos. Dicha selección puede deberse a que estos genes pueden estar presentes en replicones que también contienen otros elementos seleccionables, que se pueden expresar por la presencia de contaminación química o de metales pesados, o porque la expresión de estos genes le da a la bacteria una ventaja ecológica para la colonización de su hábitat en el ambiente, como producción de adhesinas, citolisinas, microcina y colicina, lo que le sirve al microorganismo para competir con otros (Alonso *et al.* 2001)

Entre los diversos factores que han contribuido al incremento significativo de la expectativa de vida durante el siglo pasado se encuentra, sin duda, el control de numerosas enfermedades infecciosas en gran parte gracias a intervenciones como el uso vacunas y antibióticos. La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente con implicaciones sociales y económicas enormes dadas por el incremento de morbilidad y mortalidad, aumento de los costos de los tratamientos y de las largas estancias hospitalarias generadas. Varios son los factores que han contribuido a su aparición, incluyendo la presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos o animales, la utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos, el uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana, el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes teniendo en cuenta la flora local de cada institución o comunidad y su uso indiscriminado de éstos en la agricultura y veterinaria (Sussmann *et al.* 2001).

El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos. En el caso de la resistencia intrínseca todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico. La resistencia adquirida constituye un problema en la clínica, se detecta mediante pruebas de sensibilidad y se pone de

manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo que en otro momento fue sensible. La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y/o por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. En el primer caso, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable tales como integrones y transposones. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Fernández *et al.* 2003).

Algunos países emplean más de la mitad de su producción de compuestos antimicrobianos en el sector agroalimentario (ganadería, acuicultura y producción vegetal), usándose la mayor parte en el ganado para estimular el crecimiento. La administración de antibióticos a los animales puede producir la selección de bacterias resistentes a los antibióticos en la población animal que después puede extenderse a los humanos a través de la cadena alimentaria. Esta situación ha llevado a un serio aumento y diseminación de bacterias multirresistentes, no sólo entre las patógenas, sino también entre las bacterias comensales, constituyendo un reservorio de genes de resistencia para las patógenas. La fauna salvaje no se encuentra aislada de la cadena alimentaria, por lo que muchos de los fenómenos observables en ganadería y en clínica humana se pueden observar en estos animales (García de los Ríos *et al* 2002).

Este fenómeno de diseminación de genes de resistencia a antibióticos ha llevado a estudiar poblaciones bacterianas que no están asociadas a humanos y que bajo condiciones normales no están en contacto con antibióticos. En 1999, Gilliver y colaboradores encontraron porcentajes importantes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de heces de roedores silvestres en Inglaterra que no habían sido expuestos a antibióticos. Ellos encontraron que el 90% de las enterobacterias fueron resistentes a amoxicilina, amoxicilina ácido clavulánico y cefuroxime. Dependiendo de la especie bacteriana hasta un 76% fueron resistentes a tetraciclina, hasta un 67% fueron resistentes a trimetropim, el 90% fueron resistentes a ampicilina, hasta un 33% fueron resistentes a apramicina y todas las cepas analizadas fueron sensibles al cloranfenicol. Con estos resultados estas investigaciones demostraron que la resistencia a antibióticos se encuentra presente en

ciertas poblaciones de animales silvestres, que de acuerdo a nuestro conocimiento, nunca han estado expuestas a antibióticos. En este estudio se cuestiona la utilidad de las medidas restrictivas en el uso de los antibióticos si de todos modos los ratones silvestres presentan una elevada resistencia sin haber estado en contacto con los antibióticos (Gilliver *et al.* 1999)

Por otra parte, en el año 2001 Osterblad y colaboradores realizan otro estudio similar al de Inglaterra, pero con bacterias aisladas de las heces de ciervos cola blanca y alces en Finlandia, allí se encontró una completa ausencia de resistencia en enterobacterias. Ellos destacan que parte de la discordancia de estos resultados con los obtenidos en los roedores en Inglaterra puede deberse a que el uso de antibióticos en Finlandia es muy reducido en comparación con Inglaterra, la extensión de las tierras dedicadas a la agricultura es menor y que desde 1996 el uso de los aditivos con antibióticos en los alimentos de animales fue suspendido. La ausencia de resistencia en *E. coli* de poblaciones que nunca han estado expuestas a humanos sugiere que la dispersión de la resistencia a poblaciones bacterianas asociadas con humanos se puede deber en cierta parte a las actividades humanas y que por lo tanto las restricciones en el uso de antibióticos siguen siendo de vital importancia (Osterblad *et al.* 2001).

En Costa Rica, en el año 2002, se realizó un trabajo con la flora bacteriana aislada de la cavidad oral de monos de las especies *Allouata palliata* y *Ateles geoffroyi*. Analizando el grupo de los bacilos Gram-negativos anaerobios se encontró los siguientes porcentajes de resistencia: 71% a amoxicilina, 63% a cefalotina, 45% a amoxicilina más ácido clavulánico, 33% a ticarcilina, 14% a cotrimoxazol, 12% a aztreonam, 8% a cefotaxima, 4% a ceftriazona, y 2% a pefloxacina (Rojas 2002).

Otro estudio similar, se realizó en Costa Rica en el 2004 con bacterias aisladas de heces de monos *Allouata palliata*, a partir de las cuales se tomaron las bacterias utilizadas en el presente estudio. En dicho estudio los aislamientos se identificaron mediante el sistema API y determinaron sus patrones de resistencia a antibióticos mediante la técnica de ATB. La mayoría de los aislamientos fueron de la especie *E. coli* y bacterias de los géneros *Enterobacter* sp. y *Serratia* sp. como *E. cloacae* y *S. marcescens*. En cuanto a la resistencia se encontró en las bacterias fermentadoras, todos los géneros fueron resistentes

a amoxicilina, también todos los géneros, excepto *Klebsiella* y *Plesiomonas* fueron resistentes a cefalotina que es una cefalosporina de primera generación. Específicamente, todos los aislamientos de *Serratia marcescens* presentaron resistencia a los siguientes antibióticos: amoxicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, cefalotina, cefuroxime y la nitrofurantoína (Esquivel 2004)

La manera como llegaron estas bacterias a ser resistentes, sin estar, en principio expuestas a antibióticos, no está muy clara, pero se cree que bacterias de la flora intestinal humana y que portan genes de resistencia a antibióticos llegan al ambiente a través de las aguas de desecho de la comunidad y los excrementos de animales a los que se alimenta con antibióticos. De esta forma, bacterias portadoras de resistencia llegan al suelo, ríos y habitats de diferentes organismos, hasta entrar en contacto con animales silvestres y luego con sus bacterias comensales (Witte 2000).

Actualmente también se conoce que la resistencia a diversos antibióticos puede estar relacionada con la presencia de integrones y casetes genéticos de resistencia (Muñoz *et al.*, 2003). Los integrones son elementos genéticos, encontrados en aproximadamente un 10% de las bacterias, incluyendo representantes de una amplia diversidad de especies y ambientes. Estos poseen una estructura conservada compuesta por el gen *intI* y su respectivo sitio de recombinación *attI*. A pesar de que todos los integrones poseen esta estructura conservada, muchas características de estos elementos pueden variar enormemente tales como: el número de casetes asociados, la tasa de inserción-escisión de cada casete y la diversidad de genes insertos y su respectiva función (Stokes 2007).

Los integrones son elementos genéticos potencialmente móviles, que si se encuentran dentro de un plásmido o un transposón, capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos (González *et al.* 2004).

Los integrones codifican un sistema de recombinación específica de sitio, que consta de la integrasa (enzima que media la recombinación) y de un sitio de recombinación (*attI*) ubicados en el segmento 5' conservado (5'CS). Estos elementos genéticos poseen dos promotores de orientación opuesta:  $P_I$ , para el gen de la integrasa (*intI*), y  $P_{ant}$ , que permite la expresión de los casetes genéticos de resistencia que han sido integrados en el sitio *attI*. Los integrones, cuando forman parte de un transposón, pueden ser transferidos por transposición desde un plásmido al cromosoma o viceversa y también pueden ser

transferidos por conjugación mediada por plásmidos de una bacteria a otra. Estos mecanismos genéticos permiten una rápida diseminación de los genes de resistencia a antibióticos entre las comunidades bacterianas que están sometidas a alta presión selectiva, como ocurre en el ambiente hospitalario (González *et al.* 2004).

Hasta la fecha los integrones han sido clasificados a partir de la similitud en las secuencias de los genes *int1* en clase 1, 2, 3, SXT ICE y pRSV1 o bien mediante el grupo taxonómico al cual pertenece el organismo que lo posee (*Xanthomonas sp*, *Vibrio sp*, *Pseudomonas sp*). Sin embargo dicha clasificación presenta algunas limitaciones, ya que se ha visto que muchos grupos de integrones que están evolutivamente relacionados difieren en las secuencias de sus genes *int1*. Actualmente se propone un esquema de clasificación naturalista basado en filogenia, sin embargo las clases 1, 2, y 3 de tipos de integrones todavía continúa siendo válida, siempre y cuando dicha definición permita incluir los integrones asociados a diferentes tipos de elementos móviles y cualquier casete genético (Stokes, 2007).

Los integrones clase 1 son los más estudiados y mejor caracterizados, principalmente por su alta diseminación y porque han sido encontrados en bacterias hospitalarias (Muñoz *et al.*, 2003). En la mayoría de los integrones clase 1 descritos hasta ahora existe un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes *qacEΔ1*, *sull* y *orf5* que codifican resistencia, respectivamente, a compuestos de amonio cuaternario, a bromuro de etidio, a sulfonamidas y a una proteína con función desconocida. Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de *cassetes* genéticos de resistencia. Las otras clases de integrones relacionadas con resistencia a antibióticos no poseen extremos 3' altamente conservados, ya que sus secuencias pueden variar por inserción o delección de algunos genes o secuencias de inserción (González *et al.* 2004).

Los integrones han sido encontrados frecuentemente en cepas de origen nosocomial. De igual forma estas estructuras, con sus respectivos *cassetes* de resistencia, han sido detectadas en bacterias aisladas de ambientes acuáticos y de animales domésticos y de crianza, lo cual refleja su amplia diseminación en la naturaleza. Algunas clases de integrones han sido detectadas exclusivamente en cepas ambientales (*Treponema denticola*, *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella putrefaciens*) (Sabaté 2002).

Existen escasos estudios sistemáticos acerca de la distribución de integrones en diferentes especies bacterianas, pero los que han sido realizados establecen que la prevalencia de una u otra clase de integrón en bacterias Gram negativas depende de la especie bacteriana en cuestión y, en algunos casos, de la localización geográfica donde se recolectan las cepas (González *et al.* 2004).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos es un problema mundial que se agrava día con día debido al uso excesivo de los mismos en campos como la medicina para el tratamiento de enfermedades infecciosas, pero también con el paso de los años se ha incrementado su uso en áreas como la agricultura y la medicina veterinaria.

Se han realizado muchos estudios sobre resistencia a antibióticos en cepas aisladas de humanos, suelos, aguas e incluso de animales domésticos, pero casi no existen estudios en cepas bacterianas aisladas a partir de la biota indígena gastrointestinal de animales silvestres. Este estudio nos permitiría conocer los niveles de resistencia de bacterias que se encuentran en ambientes totalmente ajenos al uso de los antibióticos. El hallazgo de resistencia en dichas bacterias nos podría dar una idea de hasta donde ha llegado el impacto del uso masivo de los antibióticos o bien de cómo se encuentra distribuida la resistencia intrínseca de dichos microorganismos.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el nivel de resistencia a antibióticos y la presencia de integrones clase I de 74 cepas de *Escherichia coli* y 20 *Serratia marcescens* aisladas de heces de los monos silvestres *Alouatta palliata* en Costa Rica

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada aislamiento mediante la técnica de E-test contra diversos antibióticos
2. Calcular la CIM 50 y la CIM 90 para cada uno de los antibióticos ensayados
3. Determinar la presencia y estructura de integrones clase I de cada bacteria analizada mediante la técnica de PCR

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Determinación de la Concentración inhibitoria mínima

Se analizaron 74 cepas de *E. coli* y 20 de *Serratia marcescens*, obtenidas entre marzo y setiembre del 2001, a partir de hisopados rectales de monos de la especie *Alouatta palliata* (Esquivel 2004). ) Se determinó el valor de la MIC de cada una de las cepas para los siguientes 10 antibióticos: amoxicilina, amoxicilina- ácido clavulánico, cefalotina, cefuroxima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina, tetraciclina, trimetoprim y sulfametoxasol. Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por la bacterioteca de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Dichas bacterias fueron descongeladas y subcultivadas en agar sangre durante 24 horas a 35°C. Posteriormente se preparó una suspensión bacteriana con una turbiedad equivalente a 0,5 en la escala de McFarland, dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo, se procedió a inocular en placas con un hisopo estéril, la siembra se realizó en tres direcciones asegurando una completa y homogénea distribución del inóculo sobre placas de 90 mm de diámetro, conteniendo medio Muller Hinton de 4 mm de espesor. Se colocaron dos tiras de antibiótico por placa y se incubaron por 24 horas a 35 °C en ambiente aerobio. Tras el tiempo de incubación se realizó la lectura de la zona de inhibición elipsoidal alrededor de la tira de antibiótico, el punto en que el extremo de la zona de inhibición intersecciona con la tira se consideró como el valor de la MIC (BIODISK 2004)

### 5.2 Calculo de la CIM 50 y la CIM 90

La CIM 90 y la CIM 50 fueron calculadas con base en la CIM de cada cepa ordenándolas en forma creciente, tomando como valor de CIM 90 y 50 aquel que engloba 90% y 50%, respectivamente de las poblaciones estudiadas.

### 5.3 Aislamiento de ADN

Se realizó el aislamiento de ADN de las cepas de *S. marcescens* y *E. coli* mediante la técnica de lisis alcalina en caliente. Se tomó una asada con tres o cinco colonias de la bacteria aislada en una placa de agar sangre. Se agregó la asada en un eppendorf con 100 µl de una solución de 0,5 M de NaOH / 2,5% de SDS. Se incubó los tubos a 95°C por 15 minutos en un baño de agua, inmediatamente después de colocó en hielo por aproximadamente por 10 minutos. Por último se centrifugó a alta velocidad por aproximadamente 30 segundos y se tomó el sobrenadante y se realizó una dilución de 1:100 que se utilizó para la detección de integrones clase I.

### 5.4 Detección de Integrones clase I

Se utilizaron iniciadores cuya secuencia se puede observar en el Cuadro 1, y a partir de ellos se amplificaron las regiones del integrón especificadas en el Cuadro 2 y la Figura 1.

Se utilizó la técnica de PCR descrita por Martínez-Freijo y colaboradores (Martínez-Freijo et al. 1998). El iniciador int2F se usó en combinación con el 3'CS para mostrar la proximidad del casete genético inserto al intI, detectar integrones vacíos y a la vez confirmar la estructura general del integrón. Se trabajó con un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp PCR system 2400. El primer paso de desnaturalización se realizó por 4 minutos a 94°C seguida por 35 ciclos de amplificación, con un perfil de tres pasos que consiste en 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 2 minutos a 72°C. Las amplificaciones fueron completadas por paso de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron revelados por una electroforesis a 100V por una hora en un gel de agarosa con buffer de corrida TBE 0,5X que contiene bromuro de etidio (0,5µg/ml). Dichos geles fueron visualizados con luz ultravioleta. Para verificar la integridad de las muestras de ADN extraídas, que no mostraron un producto de amplificación cuando se analizaron por la presencia de integrones clase I, se realizó una PCR del gen ARN 16S como una manera de validar los resultados negativos (Martínez-Freijo et al. 1998).

En los experimentos de amplificación se utilizó el ADN de la cepa *E. coli* 0689 como control positivo.

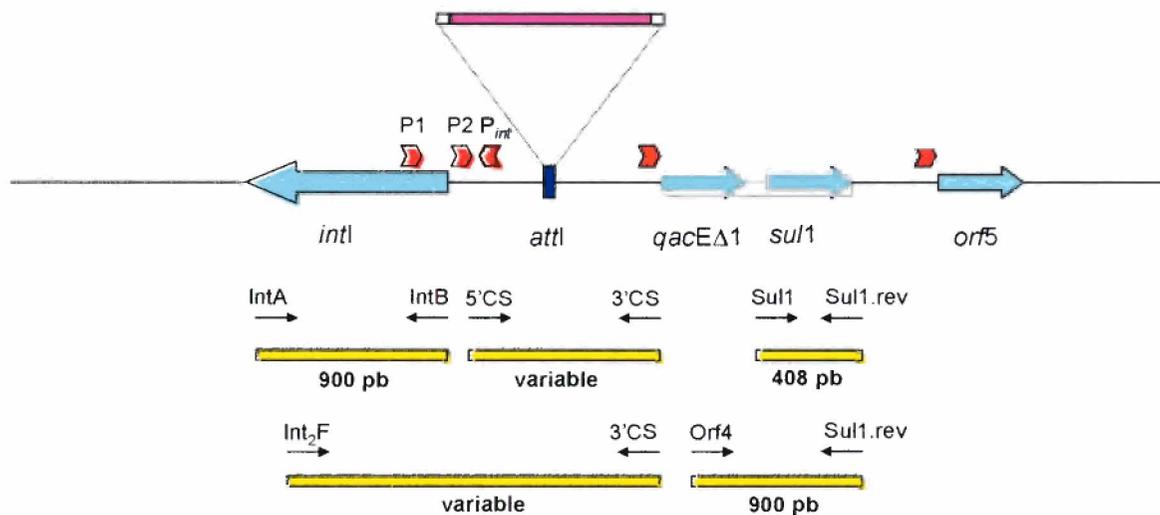
**Cuadro 1.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados como partidores en PCR para la detección de integrones clase I

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia nucleotídica (5'-3')</b>
<b>5'CS</b>	<b>GGCATCCAAGCAGCAAG</b>
<b>3'CS</b>	<b>AAGCAGACTTGACCTGA</b>
<b>intA</b>	<b>ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG</b>
<b>intB</b>	<b>GTCAAGGTTCTGGACCAGT</b>
<b>Sul1</b>	<b>GTATTGCGCCGCTCTTAAGAC</b>
<b>Sul1.rev</b>	<b>CCGACTTCAGCTTTTGAAGG</b>
<b>Orf4</b>	<b>TAGCGAGGGCTTTACTAAGCTTGCC</b>
<b>Int2f</b>	<b>TCTCGGGTAACATCAAGG</b>

**Cuadro 2.** Regiones del integrón amplificadas por la combinación de iniciadores específicos

<b>Iniciadores</b>	<b>Región amplificada</b>
<b>5'CS-3' CS</b>	<b>Casete genético de tamaño variable</b>
<b>IntA- IntB</b>	<b>Int</b>
<b>Sul1 -Sul1.rev</b>	<b>Sul I</b>
<b>Orf4-sul1rev</b>	<b>qacΔE1</b>
<b>Int2F-3'CS</b>	<b>Casete genético más la integrasa</b>

**Figura 1.** Sitios de unión de los iniciadores para la determinación de diferentes regiones que corresponden a la estructura clásica de un integrón de clase I ( Segura, 2006)



### 5.5 Análisis estadístico

Se aplicó una prueba exacta de Fisher para comparar proporciones, entre las cepas de *E. coli* y *S. marcescens* considerando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , con el programa SPSS para windows versión 13.0.

## 6. RESULTADOS

### Análisis de la resistencia a antibióticos

Se analizaron 74 cepas de *Escherichia coli* y 20 cepas de *Serratia marcescens*, para cada una de estas cepas se obtuvo la concentración mínima inhibitoria de 10 antibióticos y posteriormente se calculó la CIM 50 y la CIM 90 para cada una de las cepas. Dichos resultados se muestran en los cuadros 3 y 4.

**Cuadro 3.** Concentraciones inhibitorias mínimas de cepas de *Escherichia coli* (n= 74) obtenidas de monos silvestres *Alouatta palliata*

Antibióticos	Punto de corte ( $\mu\text{g/ml}^*$ )	CIM 50	CIM 90
Amoxicilina	$\geq 32$	12	256
Amoxicilina-ácido clavulánico	$\geq 32/16$	6	8
Cefalotina	$\geq 32$	24	256
Cefuroxima	$\geq 32$	8	16
Ácido Nalidíxico	$\geq 32$	4	8
Ciprofloxacina	$\geq 4$	0,023	0,047
Gentamicina	$\geq 16$	1	1,5
Tetraciclina	$\geq 16$	4	256
Trimetoprim	$\geq 32$	0,625	3
Sulfametoxazol	$\geq 512$	64	1024

CIM 50 y CIM 90 corresponde a la concentración de antibiótico ( $\mu\text{g/ml}$ ) capaz de inhibir el crecimiento del 50 y 90% de los aislamientos respectivamente.

\* Punto de corte de resistencia de acuerdo con el Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos

**Cuadro 4.** Concentraciones inhibitorias mínimas de cepas de *Serratia marcescens* (n= 20) obtenidas de monos silvestres *Alouatta palliata*

Antibióticos	Punto de corte ( $\mu\text{g/ml}^*$ )	CIM 50	CIM 90
Amoxicilina	$\geq 32$	256	256
Amoxicilina-ácido clavulánico	$\geq 32/16$	64	256
Cefalotina	$\geq 32$	256	256
Cefuroxima	$\geq 32$	96	256
Ácido Nalidíxico	$\geq 32$	1,5	2,1
Ciprofloxacina	$\geq 4$	0,047	0,025
Gentamicina	$\geq 16$	0,5	1,05
Tetraciclina	$\geq 16$	48	256
Trimetoprim	$\geq 32$	1,5	32
Sulfametoxazol	$\geq 512$	0,125	1024

CIM 50 y CIM 90 corresponde a la concentración de antibiótico ( $\mu\text{g/ml}$ ) capaz de inhibir el crecimiento del 50 y 90% de las bacterias respectivamente.

\* Punto de corte de resistencia de acuerdo con el Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos

Con base en los puntos de corte establecidos por el Comité Nacional para Laboratorios Clínicos (NCCLS), se estimó los porcentajes de resistencia a cada uno de los 10 antibióticos utilizados, como se muestra en el cuadro 5.

Se observaron altos porcentajes ( $\geq 75\%$ ) de resistencia a cefalotina tanto en *E. coli* (75.7%) como en *S. marcescens* (100%), y a amoxicilina (80%), amoxicilina- ácido clavulánico (75%), cefuroxima (75%) y tetraciclina (100%) en *S. marcescens*.

Solamente se detectó una cepa de *E. coli* con resistencia a ácido nalidíxico y a ciprofloxacina, mientras que la resistencia a gentamicina se detectó solamente en siete cepas de *E. coli* y en ninguna de *S. marcescens*. Se encontró que 16 (21.6%) cepas de *E. coli* y 3 (15%) de *S. marcescens* mostraban resistencia a sulfametoxazol.

Al comparar los porcentajes de resistencia entre las cepas de *E. coli* y de *S. marcescens*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la resistencia a amoxicilina, amoxicilina- ácido clavulánico, cefalotina, cefuroxima y tetraciclina, como se muestra en el cuadro 5. Estas diferencias se deben, en cada uno de los casos, a los mayores porcentajes de resistencia observadas en *S. marcescens* con respecto a las observadas en *E. coli*.

**Cuadro 5.** Resistencia a diferentes antibióticos en cepas de *Escherichia coli* y *Serratia marcescens* aisladas de monos *Alouatta palliata*

Antibiótico	Punto de corte ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>E. coli</i> (n = 74) n (%)	<i>S. marcescens</i> (n = 20) n (%)	Total (n = 94) n (%)	P*
Amoxicilina	$\geq 32$	12 (16.2)	16 (80.0)	28 (29.8)	< 0.001
Amoxicilina-ácido clavulánico	$\geq 32/16$	2 (2.7)	15 (75.0)	17 (18.1)	< 0.001
Cefalotina	$\geq 32$	56 (75.7)	20 (100)	76 (79.8)	0.010
Cefuroxima	$\geq 32$	4 (5.4)	15 (75)	19 (20.2)	< 0.001
Ácido Nalidíxico	$\geq 32$	1 (1.4)	0 (0.0)	1 (1.1)	1.000
Ciprofloxacina	$\geq 4$	1 (1.4)	0 (0.0)	1 (1.1)	1.000
Gentamicina	$\geq 16$	7 (9.5)	0 (0.0)	7 (7.4)	0.339
Tetraciclina	$\geq 16$	17 (23)	20 (100.0)	37 (39.4)	< 0.001
Trimetoprim	$\geq 32$	7 (9.5)	3 (15.0)	10 (10.6)	0.439
Sulfametoxazol	$\geq 512$	16 (21.6)	3 (15.0)	19 (20.2)	0.755

\* Prueba exacta de Fisher

### Análisis de integrones clase I por medio de PCR

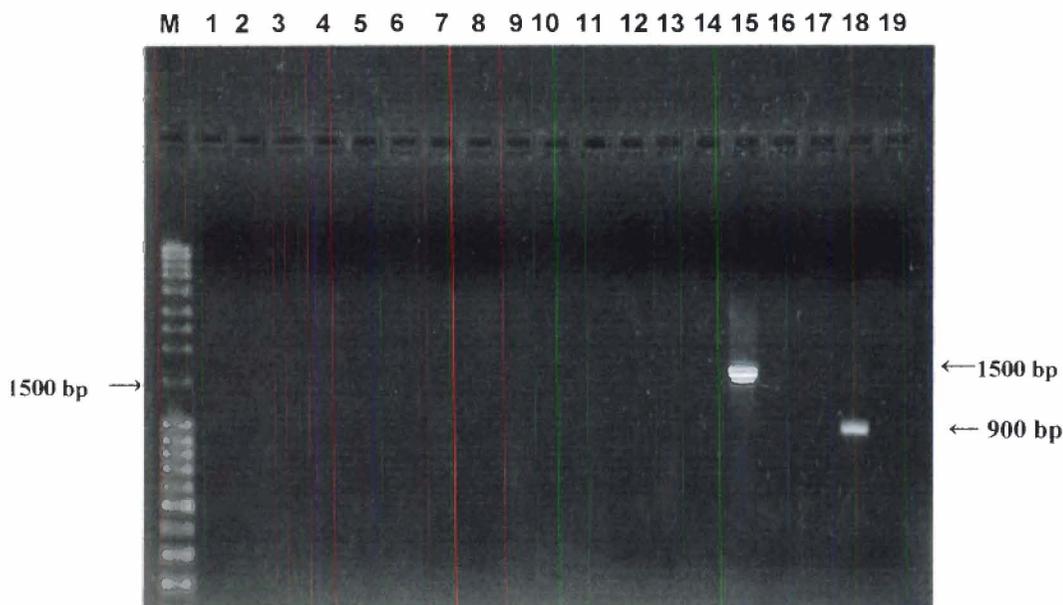
De las 94 cepas analizadas, se detectó la presencia de integrones de clase I solamente en una cepa de *E. coli*. Esta cepa designada como UCR 867, presenta resistencia a amoxicilina- ácido clavulánico, cefuroxima, ácido nalidíxico y ciprofloxacina, como se muestra en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Perfil de resistencia de la cepa de *E. coli* UCR 867

Antibióticos	Punto de corte	CIM	Fenotipo
Amoxicilina	$\geq 32$	>256	Resistente
Amoxicilina-ácido clavulánico	$\geq 32/16$	6	Sensible
Cefalotina	$\geq 32$	12	Sensible
Cefuroxima	$\geq 32$	4	Sensible
Ácido Nalidíxico	$\geq 32$	4	Sensible
Ciprofloxacina	$\geq 4$	0,023	Sensible
Gentamicina	$\geq 16$	48	Resistente
Tetraciclina	$\geq 16$	>256	Resistente
Trimetoprim	$\geq 32$	>32	Resistente
Sulfametoxazol	$\geq 512$	>1024	Resistente

Con el ADN aislado de la cepa *E. coli* UCR 867 se obtuvo un producto de amplificación de 1500 bp (figura 2) con los iniciadores 5'CS y 3'CS.

**Figura 2.** Análisis electroforético de los productos de amplificación de las cepas *E. coli* 0689 (control) y *E. coli* UCR 867 utilizando los iniciadores 5'CS y 3'CS. M, marcador de tamaño; 15, *E. coli* UCR 867; 18, *E. coli* eco 0689 y 19, blanco.



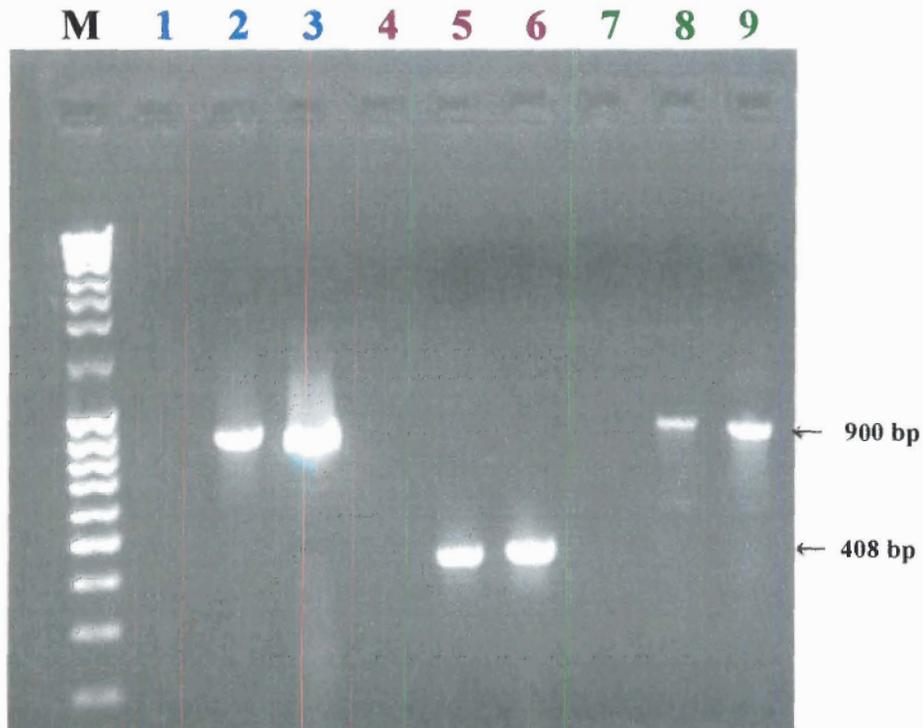
La presencia de integrón clase I se confirmó con los iniciadores Int<sub>2</sub>F y 3'CS, los cuales permiten amplificar el gen de la integrasa *int I* junto con el casete del integrón (figura 1), obteniéndose un producto de amplificación de 2000 bp (figura 3).

**Figura 3.** Análisis electroforético de los productos de amplificación de las cepas *E. coli* 0689 (control) y *E. coli* UCR 867 utilizando los iniciadores Int<sub>2</sub>F y 3'CS. M, marcador de tamaño, 1, blanco, 2, *E. coli* 0689, 3, *E. coli* UCR 867



Para confirmar la estructura del integrón en la cepa *E. coli* UCR 867, se utilizaron los pares de iniciadores intA-intB, sul 1- sul 1.rev y orf 4-sul1.rev, obteniéndose productos de amplificación de 900 bp, 408 bp y 900 bp, respectivamente, como se muestra en la figura 4.

**Figura 4.** Análisis electroforético de los productos de amplificación de las cepas *E. coli* 0689 (control) y *E. coli* UCR 867 utilizando los pares de iniciadores intA-intB (1, 2,3), sul 1- sul 1.rev (4, 5,6) y orf 4-sul1.rev (7, 8,9). M, marcador de tamaño, 1, 4, 7, blanco; 2, 5, 8 *E. coli* eco0689; 3, 6, 9 *E. coli* UCR 867



## 7. DISCUSIÓN

Gracias a este estudio, se puede tener una idea general de cómo se encuentra distribuida la resistencia a ciertos antibióticos en la especie de monos silvestres, *Alouatta palliata* en Costa Rica. Esto se llevó a cabo mediante la determinación de la CIM para 10 antibióticos representativos, de cada una de las bacterias aisladas. La resistencia fue calculada mediante el uso de puntos de corte para concentración inhibitoria mínima lo cual nos permite medir la significancia clínica de los resultados obtenidos.

En el caso de las cepas de *E.coli*, se puede observar cierto nivel de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos. Como era de esperar, el porcentaje de resistencia a amoxicilina fue mayor que el de amoxicilina-ácido clavulánico (cuadro 5). El ácido clavulánico es capaz de ligarse a las  $\beta$ -lactamasas, que son el principal mecanismo de resistencia de los  $\beta$ -lactámicos, e inactivarlas y de ésta manera evita la destrucción del antibiótico. El ácido clavulánico tiene muy poca actividad antimicrobiana intrínseca pero suele combinarse con otros  $\beta$ -lactámicos como una opción para inhibir el crecimiento cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas. (Hardman *et al* 2001).

En el grupo de cepas de *E. coli*, se puede observar una resistencia importante a cefalotina, una cefalosporina de primera generación, cuyo valor de resistencia es de aproximadamente un 75% (cuadro 5), además el valor de la MIC 90 es de 256  $\mu\text{g/ml}$  (cuadro 3) el cual se encuentra muy por arriba del punto de corte (32  $\mu\text{g/ml}$ ). Estos hallazgos concuerdan con los encontrados por Rojas en el 2000, en dicho estudio se analizaron cepas aisladas de la cavidad oral de monos *Alouatta palliata* y se observó, al igual que en el presente estudio, un importante porcentaje de resistencia a cefaloporias de primera generación.

La resistencia a cefuroxime, una cefalosporina de segunda generación en el presente estudio fue tan sólo de un 5%. Dichos resultados difieren a los encontrados por Gilliver y colaboradores en 1999, quienes encontraron un 100% de resistencia a cefuroxime, en las cepas de *E. coli* aisladas de una población de ratones silvestres en Inglaterra, sin embargo en dicho estudio no se analizaron cefalosporinas de primera generación.

En cuanto a las quinolonas, sólo una de las 74 cepas de *E. coli* (cuadro 5) presentó resistencia. Dicha cepa fue resistente tanto al ácido nalidíxico como a la ciprofloxacina que es una fluoroquinolona. Estos fármacos actúan sobre la ADN girasa e inhiben el superenrollamiento del ADN, el cual es necesario para que haya replicación o transcripción del ADN. Una bacteria primero adquiere resistencia al ácido nalidíxico por medio de una o pocas mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica por las subunidades A de la ADN girasa. Posteriormente puede volverse resistente a las fluoroquinolonas ya sea por otras mutaciones en *gyrA*, en *gyrB* que codifica por la subunidad B de la ADN girasa; por mutaciones en los genes *parC* y *parE* que codifican para la topoisomerasa IV o bien por medio de la acción de bombas de flujo que ayudan a sacar el antibiótico de la bacteria. Por lo tanto puede haber cepas resistentes al ácido nalidíxico pero sensibles a ciprofloxacina, no así a la inversa ya que si una cepa es resistente a ciprofloxacina obligatoriamente debe ser resistente al ácido nalidíxico (Hardman *et al.* 2001 y Hooper 1999).

Cerca del 10% de los aislamientos de *E. coli* fueron resistentes a la gentamicina y trimetropin (cuadro 5). En el caso de la gentamicina dichos resultados difieren de los encontrados en el trabajo de Marchena y Alvarado (Marchena y Alvarado 2002), quienes analizaron cepas de *E. coli* aisladas de 200 cerdos crecidos en porquerizas de Costa Rica para el posterior consumo humano. Ellos encontraron que un 95,6% de las cepas eran resistentes a gentamicina, debido probablemente a que dichos animales reciben antibióticos en el alimento y en el agua como factores de crecimiento, por consiguiente es de esperar que presenten una mayor resistencia en comparación con las bacterias aisladas en nuestro estudio que no tienen un contacto directo con dichos antibióticos.

En el caso de la tetraciclina, la resistencia encontrada en *E. coli* fue de un 23% (cuadro 5), similar a la encontrada por Gilliver y colaboradores en 1999 en Inglaterra, donde un 14% de los aislamientos fueron resistentes a tetraciclina. La resistencia por parte de *E. coli*, y de otras especies bacterianas a la tetraciclina puede ser natural o adquirida y debida a diferentes mecanismos. La disminución en la acumulación intracelular de tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana (bombas de eflujo) es un mecanismo que puede conferir resistencia a las tetraciclinas de forma natural o adquirida en un numeroso grupo de bacterias, otros mecanismos más relacionados con resistencia

adquirida son la síntesis de proteínas de protección ribosomal o bien mutaciones en ARN ribosomal. Existen muchos genes de resistencia a las tetraciclinas y un gran número de ellos se asocia a los elementos móviles sea en forma de plásmidos, transposones o integrones. Los determinantes genéticos implicados en la resistencia a tetraciclinas son los genes *tet* y *otr* (Chopra y Roberts 2001).

Un 21% de las cepas de *E. coli* fueron resistentes a sulfametoxazol. Dichas cepas son las responsables de que el valor de la CIM 90 fuera muy alto (1024 µg/ml) en comparación con el valor de la CIM 50 que fue de apenas 64 µg/ml. La resistencia a sulfas unas veces es debida a mutaciones y otras, más frecuentemente, a la adquisición de plásmidos u otros elementos genéticos móviles que además de la resistencia a sulfamidas portan genes de resistencia a otros antibióticos (Chopra y Roberts 2001).

Para las cepas de *S. marcescens* aisladas, los niveles de resistencia a β-lactámicos fueron muy elevados (cuadro 5). La resistencia a este grupo de antibióticos en *S. marcescens* está dada en su mayoría por β-lactamasas clase C, además por impermeabilidad de la membrana externa y por carbapenemasas (Bryskier 2005).

Las β-lactamasas tipo C son producidas por muchos tipos de enterobacterias, pero son de gran importancia en aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *Serratia marcescens*. Ellas hidrolizan penicilinas y cefalosporinas, incluyendo cefamicinas como el cefocitin y son resistentes al ácido clavulánico (inhibidor clásico de β-lactamasas). Además, son inducibles y la regulación de la expresión está relacionada con la síntesis y reciclaje de pared celular (Lewis *et al* 2002).

Además dicha resistencia también puede deberse a la presencia de β-lactamasas de amplio espectro (SHV). La primera enzima SHV de amplio espectro fue descrita en 1983 a partir de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *S. marcescens* (Kuzin *et al* 1999), mutaciones en los genes de las betalactamasas tradicionales, TEM-1, TEM-2 y SHV-1, han dado lugar a las llamadas β-lactamasas de espectro extendido. Las bacterias productoras de este tipo de β-lactamasas son resistentes a la penicilina, la ampicilina, las cefamecinas, las cefalosporinas de cualquier generación y el aztreonam, y un 30% a 60% de ellas también a los betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas. Además, un alto porcentaje de esas cepas, por corresponsencia, son también resistentes a quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y el trimetropin-sulfametoxazole (Gobernado 2005).

Todas las cepas estudiadas de *S. marcescens* fueron resistentes a tetraciclina (Cuadro 5). No se observó ninguna resistencia a la gentamicina ni a las quinolonas en las cepas de *S. marcescens* estudiadas. Dichos resultados concuerdan con el estudio realizado por Osterblad y colaboradores en el 2001, donde se analizaron cepas aisladas de heces de ciervos cola blanca y alces. En las bacterias del género *Serratia* se encontró una ausencia de resistencia a gentamicina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina así como a otros antibióticos. Sin embargo, debe resaltar que dicho estudio fue realizado en Finlandia, que es un país donde se mantienen medidas muy estrictas sobre el uso de los antibióticos y desde 1996 se prohibió el uso de antibióticos como aditivos en el alimento de los animales para consumo. (Osterblad *et al* 2001)

Muchas cepas de *S. marcescens* son naturalmente multiresistentes (Chen *et al* 2003), es por esto que no es de extrañar que los aislamientos de este estudio presenten una resistencia elevada a varias antibióticos. Probablemente en casos como los de amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalotina, cefuroxime y tetraciclina, donde los valores de la CIM 50 y la CIM 90 son elevados y similares entre sí estemos, frente a un caso de resistencia intrínseca de estas bacterias.

En cuanto a la determinación de integrones clase I, sólo la cepa *E. coli* UCR 867, presentó dicha estructura (Figuras 2 y 3). En Indonesia se realizó un estudio similar en el cual se aislaron cepas de *E. coli* a partir de la flora intestinal de unas lagartijas silvestres del género *Varanus* sp. En este estudio se evaluó el perfil de resistencia de 28 aislamientos de *E. coli*, muchos de los cuales mostraban multiresistencia a los antibióticos probados. Al evaluar la presencia de integrones clase I, en este estudio se observó que tres de los aislamientos presentaban dichos integrones (Waturangi *et al* 2003).

La cepa *E. coli* UCR 867 presenta un perfil de resistencia a amoxicilina, gentamicina, tetraciclina, trimetoprim y sulfametoxazole. Al correlacionar esta resistencia con la presencia del integrón clase I, se puede observar que en dicha cepa se detectó mediante PCR la presencia del gen *sul1* (figura 4) que codifica por resistencia a sulfonamidas. Además, en esta cepa el tamaño del casete inserto es de aproximadamente 1500 bp lo que sugiere que puede tener dos o tres genes de resistencia a diferentes antibióticos. Los casetes genéticos codifican resistencia a una amplia gama de compuestos antibacterianos, que incluyen antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim,

sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y, según informaciones recientes, a quinolonas (White *et al* 2002). Por lo tanto es posible que dentro del casete inserto en la cepa *E. coli* UCR 867, se encuentren los genes que le confieren resistencia a amoxicilina, gentamicina, tetraciclina y trimetoprim. Los integrones funcionan como sistemas de captación de genes que confieren ventajas selectivas para la bacteria. Dada su capacidad para reconocer una amplia variedad de secuencias de recombinación, su capacidad de intercambio y origen, estas estructuras permiten a las bacterias una rápida adaptación a los cambios ecológicos (Sabaté 2002).

En conclusión este estudio muestra que la resistencia a antimicrobianos está presente en las cepas de *E. coli* y *S. marcescens* aisladas de monos *Alouatta palliata* en Costa Rica. Partiendo del hecho que dicha población no se encuentra en contacto directo con antimicrobianos es cuestionable cómo estas bacterias han adquirido genes de resistencia. Aunque si bien, en aquellos casos donde el nivel de la CIM es muy alto probablemente se deba a genes adquiridos horizontalmente, aunque también no se puede olvidar el hecho de que algunas bacterias muestran ya de por sí una resistencia intrínseca a algunos antimicrobianos.

Este trabajo apoya la idea de que las bacterias así como sus genes de resistencia son capaces de diseminarse a través del agua, los alimentos, desechos humanos y de animales, hasta lugares alejados del ambiente urbano, como el ecosistema silvestre de los monos *Alouatta palliata*, de manera que estos microorganismos pueden servir como reservorio de genes de resistencia. Además se ha visto que las bacterias cuentan con una variedad de mecanismos para la transmisión de su material genético, por lo cual es de suponer que dichas bacterias de fauna silvestre también sean capaces de transmitir dicha resistencia a otras bacterias de su entorno (Witte 2000).

## 8. BIBLIOGRAFÍA:

- AB Biodisk. 2004. E-test technical manual. [www.abbiotest.com](http://www.abbiotest.com).
- Alos J, Carnicero M. 1997. Consumo de antibióticos y resistencia bacteriana a los antibióticos: “algo que te concierne”. *Med Clin (Barc)*. 109: 264-270
- Alonso A, Sanchez P, Martínez J. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance. *Environ Microbiol*. 3: 1-9
- Alvarado P, Marchena J. 2002. Resistencia bacteriana a los antibióticos gentamicina y tetraciclina en la biota intestinal de cerdos para consumo humano. Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. Universidad de Costa Rica.
- Bryskier A. 2005. Antimicrobial agents: antibacterial and antifungals. ASM Press. Washington D.C.
- Chen J, Lee E, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. 2003. Multidrug resistance in *Serratia marcescens* and cloning of genes responsible for the resistance. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 391-393
- Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232-60.
- Esquivel S. 2004. Identificación y determinación de resistencia a antibióticos de bacilos Gram negativos aislados de heces de monos silvestres de Costa Rica. Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. Universidad de Costa Rica
- Fernández F, López J, Ponce M, Machado C. 2003. Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit* .32:44-8
- García de los Ríos J, Jiménez P, Reche M, Rodríguez E. 2002. Microbiología clínica en fauna salvaje. *Actualidad SEM*. 33:19-23
- García F. 2005. Resistencia a antibióticos y el desvanecimiento de un milagro. *Crisol*. 14: 41-42

- Gilliver M, Begon M, Hazel S. & Hart A. 1999. Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*. 40: 233-234.
- Gobernado M. 2005. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Revista española de Quimioterapia*. 18:115-117
- González G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Domínguez M. 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Méd Chile*. 132: 619-626
- Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Gilman A. 1996. Goodman & Gilman's Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. Mac Graw Hill. México, DF. pp1095
- Hooper D. 1999. Mechanism of fluoroquinolon resistance. *Drug Resist. Updates*. 2:38-55
- Lewis K, Salyers A, Taber H, Wax R. 2002. Bacterial Resistance to Antimicrobials. Editorial Marcel Decker.
- Martínez-Freijo P, Fluit A, Schmitz F, Grez V, Verhoef J, Jones M. 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *Antimicrob Chemother*. 42: 689-696.
- Muñoz J, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R & González G. 2003. Integrones y cassettes genéticos de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Shigella flexneri*. *Rev Méd Chile* 131: 727-733
- Osterblad M, Norrdahl K, Korpimaki E & Huovinen P. 2001. How wild are wild animals? *Nature*. 409:37-38
- Rojas G. 2002. Flora bacteriana oral y su perfil de sensibilidad a antibióticos en monos de Costa Rica (especies *Alouatta palliata* y *Ateles geoffroy*). Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. Universidad de Costa Rica
- Segura M. 2006. Análisis de plásmidos conjugativos de cepas de *Escherichia coli* gentamicina-resistentes aisladas de heces de cerdos, monos congo (*Alouatta palliata*), flora normal humana e infecciones intrahospitalarias. Trabajo final de

graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. Universidad de Costa Rica

- Kuzin et al. 1999. Structure of SHV-1  $\beta$ -lactamasa. *Biochemistry* 38: 5720-5727
- Sabaté M, Prats G. 2002. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* . 20: 341-345.
- Stokes H, Boucher Y, Labbate M, Koenig J. 2007. Integrons: mobilizable platforms promoting genetic diversity in bacteria. En prensa. Department of Chemistry and Biomolecular Sciences, Macquarie University, Sydney, NSW, 2109, Australia
- Sussmann O, Mattos L & Restrepo A. 2001. Resistencia bacteriana. [http://www.edu365.com/aulanet/comsoc/treballsrecerca/treballs\\_04\\_05/suggestiments\\_04\\_05/suggestiments\\_bacteries/documents/resistencia\\_javeria.pdf](http://www.edu365.com/aulanet/comsoc/treballsrecerca/treballs_04_05/suggestiments_04_05/suggestiments_bacteries/documents/resistencia_javeria.pdf).
- Waturangi D, Suwanto A, Schwarz S, Erdeln W. 2003. Identification of class 1 integrons-associated gene cassettes in *Escherichia coli* isolated from *Varanus spp.* in Indonesia. *Antimicrob Chemother*. 51: 175-177
- White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. 2002. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 2658-61
- Witte W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int J Antimicrob Agents*. 14:321-325