



**Facultad de Ciencias**

**Caracterización de la resistencia a tetraciclina en *Salmonella*  
Typhimurium proveniente de aislamientos clínicos colombianos**

**Trabajo entregado para optar al grado de  
Magister en Bioquímica por**

**Elizabeth Noelia Ubillus Borja**

**Director de Tesis: Dr. José Miguel Villarreal  
Co-Director de Tesis: Dra. Magdalena Wiesner**

**Bogotá – Colombia Junio  
2019**



## DEDICATORIA

*Esta tesis es dedicada a todas las personas que directa o indirectamente me han guiado hasta aquí y tienen fe en mí como persona y profesional.*

## FINANCIAMIENTO

Este proyecto de tesis fue financiado por el proyecto Colciencias SIGP 210471250745, los fondos internos del Instituto Nacional de Salud - Colombia y el Programa de Reciprocidad de Becas para Extranjeros de ICETEX en Colombia.

Este trabajo fue desarrollado en los laboratorios del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud - Colombia, y en colaboración con el Proyecto de 10 000 Genomas de Salmonella de la Universidad de Liverpool.

## AGRADECIMIENTOS

Hace 2 años no podía imaginar estar involucrada en esta aventura de estudiar una Maestría en Bioquímica en un país diferente al mío. Es curioso como en los momentos más inesperados Dios nos bendice abriendo oportunidades que nos retan, pero al mismo tiempo nos enseñan que tenemos la capacidad para lograr todo lo que nos proponemos. Me siento orgullosa de decir que gracias a él logré la meta de ser egresada de la Universidad Antonio Nariño, y además estoy encantada por haber conocido Colombia y llevarme los mejores recuerdos en esta etapa de mi vida.

Agradezco infinitamente el apoyo recibido por el Doctor José Miguel Villarreal y la Dra. Magdalena Wiesner, quienes apostaron por mis capacidades para aprender sobre el mundo bacteriano; pero sobre todo por su aprecio y amistad, la cual espero conservar el resto de mi vida.

Me siento honrada por haber sido tesista del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud de Colombia, y por haber conocido a tantos expertos en salud pública e investigación que me brindaron sus consejos y anécdotas para el desarrollo de esta tesis.

Doy gracias a aquellas jóvenes que se volvieron amigas de ciencia, confidentes y consejeras, que con cada ocurrencia hicieron muy divertida mi estadía en el país: Liz, Paloma, Nancy, Zonia, Gabriela, Patty y Tatiana.

Aprecio de igual manera el esfuerzo de mi familia por inculcarme valores y motivarme a seguir cuando las fuerzas se me agotaban. Cada palabra de aliento llena de buenos deseos quedarán grabadas en mis pensamientos.

## INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	1
FINANCIAMIENTO .....	2

AGRADECIMIENTOS .....	3
INDICE DE CONTENIDOS .....	4
INDICE DE FIGURAS .....	7
INDICE DE TABLAS .....	8
ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	13
INTRODUCCIÓN .....	15
Marco teórico .....	15
Generalidades de la bacteria, patogenicidad y virulencia .....	15
Multirresistencia de <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	16
¿Qué es la tetraciclina? .....	16
Mecanismo de acción de las tetraciclinas .....	18
Resistencia a tetraciclina .....	19
Estado del Arte .....	26
Planteamiento del problema .....	32
Hipótesis o pregunta de investigación .....	34
Objetivo General .....	34
Objetivos Específicos .....	34
MÉTODOS .....	35
Diseño metodológico y muestra .....	35
Extracción y purificación de ADN total .....	35
Detección y amplificación de genes que otorgan resistencia a tetraciclina .....	36
Sensibilidad a tetraciclina .....	36
Perfil plasmídico .....	37

Análisis de las secuencias obtenidas por WGS .....	38
Análisis de la expresión de proteínas de membrana externa (OMPs). .....	39
Análisis de clonalidad por PFGE .....	41
RESULTADOS .....	44
Determinantes de resistencia a tetraciclina y sensibilidad antimicrobiana .....	44
Análisis de grupos de incompatibilidad plasmídico .....	47
Análisis del entorno genómico por secuenciamiento de genoma completo (WGS) .....	50
Análisis de las secuencias positivas a <i>tet(A)</i> .....	51
Análisis de las secuencias positivas a <i>tet(B)</i> .....	56
Análisis de las secuencias positivas a <i>tet(G)</i> .....	57
Análisis de las OMPs .....	59
Análisis de la clonalidad por PFGE .....	59
DISCUSIÓN .....	61
CONCLUSIONES .....	67
PERSPECTIVAS .....	68
LITERATURA CITADA .....	69
ANEXOS .....	89
1. Protocolo de PCR para el gen <i>tet(A)</i> .....	89
2. Protocolo de PCR para el gen <i>tet(B)</i> .....	90
3. Protocolo de PCR para el gen <i>tet(G)</i> .....	91
4. Protocolo de PCR para ‘Left junction’ .....	92
5. Protocolo de PCR para ‘Right junction’ .....	93
6. Soluciones para lisis alcalina y aislamiento de plásmidos .....	94
7. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncA/C .....	95
8. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncX1 .....	96

9. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncFII .....	97
10. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncHI1 .....	98
11. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncHI2 .....	99
12. Buffers utilizados en PFGE .....	100
13. SDS-PAGE de extracción de proteínas de membrana externa expuestas a tetraciclina	
101	

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Farmacóforo mínimo de la familia de tetraciclinas. Tomado de Thaker <i>et al.</i> 2010 (30). .....	18
Fig. 2 Mecanismo de acción de la tetraciclina en bacterias Gram negativas. Elaboración propia. .....	19
Fig. 3 Mecanismo de resistencia a través de bombas de eflujo. Elaboración propia .....	21
Fig. 4 Mecanismos de movilización de los transposones. Modificado de Campbell et al. 2008 (60) .....	24
Fig. 5 Distribución de genes de resistencia a tetraciclina en aislamientos clínicos colombianos de Salmonella Typhimurium. Se determinó que el gen tet(A) es el predominante en los aislamientos clínicos colombianos analizados resistentes a tetraciclina. ....	44
Fig. 6 Distribución de genes tet en muestras de materia fecal. ....	45
Fig. 7 Distribución de genes tet en muestras de hemocultivo. ....	45
Fig. 8 Visualización de la diversidad de plásmidos en aislamientos clínicos colombianos .	48
Fig. 9 Distribución de los grupos de incompatibilidad en relación a la procedencia de la muestra .....	49
Fig. 10 Presencia simultánea de genes de resistencia <i>tet</i> con grupos de incompatibilidad	



plasmídicos .....	50
Fig. 11 Entornos genéticos vinculados al gen <i>tet(A)</i> . .....	54
Fig. 12 Cambios aminoacídicos encontrados en el gen <i>tet(A)</i> .....	55
Fig. 14 Entorno genómico del gen <i>tet(G)</i> .....	58
Fig. 15 Variación de los perfiles de expresión de proteínas de membrana externa después de la exposición a tetraciclina. ....	59
Fig. 16 Dendograma de PFGE - XbaI y su relación con los genes <i>tet</i> . ....	60

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Mezcla de restricción enzimática .....	42
Tabla 2 Relación entre la procedencia de los aislamientos y los principales genes determinantes de resistencia a tetraciclina.....	46
Tabla 3 Prueba de independencia Chi cuadrado .....	46
Tabla 4 Determinación del nivel de susceptibilidad a tetraciclina de aislamientos representativos .....	47

## ABREVIATURAS

- 30s Subunidad ribosomal bacteriana
- ACSSuT Ampicilina-cloranfenicol-estreptomicina-sulfonamida-tetraciclina
- ADN Ácido desoxirribonucleico
- ARNt Ácido ribonucleico de transferencia
- BHI Caldo infusión cerebro corazón
- C Carbono
- EDA Enfermedad diarreica aguda
- ETA Enfermedad transmitida por alimentos
- FDA Food and Drug Administration
- H Antígeno flagelar
- Inc Grupo de incompatibilidad plasmídico
- IS Secuencia de inserción
- kb Kilobases
- LB Caldo Luria Bertani
- MFS Superfamilia de facilitadores principales
- Mg Magnesio
- MIC Concentración mínima inhibitoria
- min Minutos
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Fosfato de disodio
- NADPH Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
- NTS Salmonella no tifoidea
- O Antígeno somático
- OMP Proteína de membrana externa
- OMS Organización Mundial de la Salud
- PFGE Electroforesis en campo pulsado
- pSTV Plásmido de virulencia de Salmonella
- s Segundos
- SCV Vacuola contenedora de Salmonella

- SGI1 Isla genómica de Salmonella tipo 1
- SPI1 Isla genómica de patogenicidad tipo 1
- SPI2 Isla genómica de patogenicidad tipo 2
- TAE Tris-Acetato-EDTA
- Tn Transposón
- $\mu\text{g/ml}$  microgramos/mililitro
- Vi Antígeno capsular
- WGS Secuenciamiento de genoma completo

## RESUMEN

Las salmonelas no tifoideas (NTS, por sus siglas en inglés) son uno de los mayores causantes de enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos a nivel mundial (1). Además, estas bacterias se encuentran dentro de la lista prioritaria de la OMS debido al desarrollo y dispersión de multirresistencia a antibióticos (2). Entre ellas, la incidencia de resistencia a tetraciclina se documentó en el brote internacional de infecciones por *Salmonella* Typhimurium ocurrido entre los años 2008 al 2010 en los Estados Unidos, Reino Unido y Canadá (3). En Colombia, la vigilancia nacional de Enfermedad Diarreica Aguda realizada por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud confirmó que el 77.7% (n=2167) de los aislamientos clínicos de *S. Typhimurium* recuperados desde 1997 hasta el 2016 son resistentes a tetraciclina.

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar los principales determinantes de resistencia a tetraciclina (*tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)*) en aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium, para lo cual se investigaron 150 aislamientos, mayoritariamente provenientes de materia fecal y hemocultivo, de los cuales 100 fueron analizados por WGS y 50 por PCR de ADN total. Los resultados obtenidos de manera general confirman que 60.0% (n=90) del total de muestras estudiadas son positivos a *tet(A)*, 7.3% (n=11) a *tet(B)*, 14.0% (n=21) a *tet(G)* y 12.7% (n=19) a *tet(A)/(G)*. Correlacionando el gen de resistencia con los resultados de MIC, se encontró que las cepas que portaban *tet(A)* o *tet(B)*, fueron resistentes a concentraciones superiores a 128 µg/ml, mientras que los aislamientos *tet(G)* positivos presentaron inhibición a 64 µg/ml. Adicionalmente, se evidenció mayor presencia de *tet(G)* en muestras de hemocultivo.

El entorno genómico de los aislamientos analizados por WGS se caracterizó por ser distinto en cada determinante de resistencia a tetraciclina: el 58.57% de los positivos a *tet(A)* inserto en un Tn1721 replicativo, todos los positivos a *tet(B)* insertos en un Tn10 conservativo y los positivos a *tet(G)* probablemente posean el gen dentro de la SGI1 cromosomal. Esta distinción podría explicar mayor predominancia de un gen sobre los otros determinantes *tet*.

Además, al determinar los principales grupos de incompatibilidad de plásmidos reportados en aislamientos clínicos (A/C, X1, HI1, HI2 y FII), se halló que en los aislamientos de materia fecal mayoritariamente hubo presencia del grupo IncA/C; en comparación, en hemocultivo predominó el grupo IncFII. En ambos casos hubo coexistencia de otros grupos de incompatibilidad en menor porcentaje.

Asimismo, mediante la prueba de electroforesis en campo pulsado (PFGE) con la enzima XbaI se generó un dendrograma por UPGMA y se encontraron dos clados principales. El primer clado fue el que albergó mayor cantidad de cepas que portaban genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* sin distinción; y el segundo clado solo se ubicaron aislamientos que portaban *tet(A)*; lo que indicaría una falta de relación clonal en relación al determinante de resistencia.

Se concluye que la resistencia a tetraciclina en aislamientos clínicos colombianos de *Salmonella* Typhimurium se relaciona principalmente con los genes *tet(A)*, *tet(G)* y *tet(B)* respectivamente; y el rango de resistencia de la cepa va a depender del tipo de gen que posee. Además, cada gen está contenido en un entorno genómico característico; con excepción de *tet(A)*, el cual tiene entornos genómicos muy variables.

Finalmente, se requieren estudios posteriores para confirmar si la resistencia es cromosomal o plasmídica. Como también para explicar mecanismos sinérgicos de resistencia antimicrobiana vinculados a las proteínas de membrana externa.

## ABSTRACT

Nontyphoidal salmonella (NTS) is one of the major causes of bacterial diseases transmitted by food worldwide (1). In addition, these bacteria are on the WHO priority list due to the development and dispersion of multiresistance to antibiotics (2). Among them, the incidence of tetracycline resistance was documented in the international outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections occurred between 2008 and 2010 in the United States, the United Kingdom and Canada (3). In Colombia, the national surveillance of Acute Diarrheal Disease performed by the Microbiology Group of the Instituto Nacional de Salud confirmed that

77.7% (n=2167) of the clinical isolates of *S. Typhimurium* recovered from 1997 to 2016 are resistant to tetracycline.

The objective of this research was to characterize the main determinants of resistance to tetracycline (*tet(A)*, *tet(B)* and *tet(G)*) in clinical isolates of *Salmonella Typhimurium*, for which 150 isolates were investigated, mostly from material fecal and blood culture, of which 100 were analyzed by WGS and 50 by PCR of total DNA. The results obtained in a general way confirm that 60.0% (n=90) of the total samples tested are positive at *tet(A)*, 7.3% (n=11) at *tet(B)*, 14.0% (n=21) at *tet(G)* and 12.7% (n=19) to *tet(A)/(G)*. By correlating the resistance gene with the MIC results, it was found that the strains that carried *tet(A)* or *tet(B)*, were resistant to concentrations higher than 128 µg / ml, whereas the *tet(G)* positive isolates showed inhibition at 64 µg/ml. Additionally, greater presence of *tet(G)* in blood culture samples was evidenced.

The genomic environment of the isolates analyzed by WGS was characterized by being different in each determinant of resistance to tetracycline: 58.57% of the positives to *tet(A)* inserted in a replicative Tn1721, all the positives to *tet(B)* inserted in a Conservative Tn10 and positives to *tet(G)* probably possess the gene within the chromosomal SGI1. This distinction could explain the greater predominance of a gene over the other tet determinants.

In addition, when determining the main groups of incompatibility of plasmids reported in clinical isolates (A/C, X1, HI1, HI2 and FII), it was found that in the isolates of fecal matter there was a predominance of the IncA/C group; in comparison, the IncFII group predominated in blood culture. In both cases there was coexistence of other incompatibility groups in a lower percentage.

Also, by means of the pulsed field electrophoresis test (PFGE) with the XbaI enzyme, a dendrogram was generated by UPGMA and two main clades were found. The first clade was the one that harbored a greater number of strains that carried genes *tet(A)*, *tet(B)* and *tet(G)* without distinction; and the second clade only isolates were placed that carried *tet(A)*; which would indicate a lack of clonal relation in relation to the determinant of resistance.

It is concluded that tetracycline resistance in Colombian clinical isolates of *Salmonella* Typhimurium is mainly related to the *tet(A)*, *tet(G)* and *tet(B)* genes respectively; and the resistance range of the strain will depend on the type of gene it has. In addition, each gene is contained in a characteristic genomic environment; except for *tet(A)*, which has very variable genomic environments.

Finally, further studies are required to confirm whether the resistance is chromosomal or plasmidic. As well as to explain synergistic mechanisms of antimicrobial resistance linked to outer membrane proteins.

## INTRODUCCIÓN

### Marco teórico

#### Generalidades de la bacteria, patogenicidad y virulencia

La salmonelosis es ocasionada por *Salmonella* spp. el cual es un bacilo anaerobio facultativo no esporulativo, Gram negativo, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (4,5). Su caracterización bioquímica se describe como: catalasa positiva, oxidasa negativa, no fermentadora de lactosa, con condiciones óptimas de crecimiento a pH 7 y 37°C de temperatura (6). Taxonómicamente, este género consiste en solo dos especies: *S. bongori* y *S. enterica* (7). Esta última se divide en las siguientes seis subespecies: *S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. houtenae* y *S. enterica subsp. indica* (8). Adicionalmente, las subespecies se subdividen bajo el esquema estándar Kauffman-White-Le Minor (9), el cual identifica los serovares por medio de una fórmula antigénica, que corresponde a los antígenos somático (O), capsular (Vi) y flagelares (H) (8). Además, a nivel clínico la infección puede ser tifoidea sí se asocia con fiebre tifoidea en humanos, o no tifoidea si genera principalmente gastroenteritis (10).

La patogénesis de la infección en humanos comienza cuando las bacterias ingresan al tracto digestivo a través de agua o alimentos contaminados. Una vez que se encuentran cerca al

epitelio intestinal activan la isla genómica de patogenicidad tipo I (SPI-1), la cual es una región de ADN de 40 kb insertada en el cromosoma bacteriano que codifica un sistema de secreción tipo III, que transporta proteínas bacterianas al citosol de las células epiteliales que recubren la pared intestinal, lo que resulta en reordenamientos del citoesqueleto que median el ingreso de la bacteria a través de una vesícula de membrana denominada vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV) (11). Posteriormente, ya dentro de la célula epitelial se activa una segunda isla de patogenicidad (SPI-2) que codifica un segundo sistema de secreción tipo III, el cual modifica el ambiente intracelular a beneficio de la bacteria y promueve una infección persistente (12). Después de la infección del epitelio intestinal, *Salmonella* migra a la lámina propia de la región ileocecal donde infecta a los fagocitos (13). La severidad de la infección, o virulencia, dependerá del serovar de la bacteria y del estado inmunológico del hospedero, pudiendo ocasionar síntomas como: gastroenteritis, bacteriemia y portabilidad asintomática crónica (14–16). En la gastroenteritis la infección suele ser autolimitada y no se extiende más allá de la lámina propia. Sin embargo, en la bacteriemia, los fagocitos infectados obtienen acceso al torrente sanguíneo, lo que permite que las bacterias se propaguen al hígado y al bazo, pudiendo persistir en la vesícula biliar y la médula ósea, lo que conlleva a una enfermedad crónica (12).

### Multirresistencia de *Salmonella* Typhimurium

Desde hace unas décadas en todos los continentes se ha reportado a las *Salmonellas* no tifoideas, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) y serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) como los principales responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos (17). Además, desde mediados de los años 60 a nivel mundial se han publicado múltiples artículos donde se reporta la multirresistencia de *Salmonella* Typhimurium frente a diversas familias de antibióticos (18,19). Más específicamente, el análisis retrospectivo a lo largo de varias décadas determinó que la presencia de resistencia al antibiótico tetraciclina ha sido constante, convirtiéndola en una amenaza para la salud pública (19–23).

### ¿Qué es la tetraciclina?



Las tetraciclinas son una familia de antibióticos que fueron descubiertas en los años 40 y su utilidad clínica ha demostrado que son activas contra una amplia gama de agentes de enfermedades infecciosas, desde patógenos Gram positivos y Gram negativos hasta micoplasmas, clamidias intracelulares, rickettsias y parásitos protozoarios (24). A nivel químico pertenecen a la clase de policétidos, los cuales son metabolitos secundarios obtenidos mediante polimerización de grupos acetilo y propionilo. Estos metabolitos son sintetizados naturalmente por actinomicetos (25), a través de un complejo proteico de policétidos sintetas tipo II (PKS) que funcionan como subunidades separadas (26), pero que como mínimo posee dos subunidades de cetosintasa (KSa y KSb) y una proteína transportadora de acilo (ACP). En consecuencia, para su síntesis se realizan múltiples reacciones con distintas enzimas que forman productos intermedios inestables, lo que ha conllevado a que sea complejo el poder estandarizar el mecanismo completo (27).

Los primeros compuestos descritos del grupo de tetraciclinas, también denominados de primera generación se denominaron clortetraciclina (aureomicina) y oxitetraciclina (terramicina), y se aislaron de *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus* respectivamente (24). Ambos se descubrieron de manera independiente, pero su posterior análisis determinó que los dos poseían un núcleo naftaceno de cuatro anillos, donde el anillo D es aromático pero los anillos A, B y C incluyen centros saturados de carbono. Además, también compartían similitud en algunos grupos funcionales; esta estructura se denominó tetraciclina (28). Al realizar la comparación de la clortetraciclina con la oxitetraciclina, la primera carece de un grupo hidroxilo y tiene un sustituyente del átomo de cloro. Posteriormente se descubrió que la tetraciclina era el precursor de la clortetraciclina y tenía mayor potencia como antimicrobiano; este compuesto fue aprobado para uso clínico por la Food and Drug Administration (FDA) en 1954 (29).

Estudios posteriores en la familia de tetraciclinas determinaron que las propiedades antibióticas se conservan aún después de la modificación química de la parte superior de la molécula en las posiciones C4 a C7. Por otro lado, las posiciones C10 a C12 localizadas en la parte inferior no deben sustituirse. En particular, la región que consiste en C11 y C12 comprende la presencia de grupos funcionales ceto-enol, que proporciona la capacidad de secuestrar cationes divalentes de metales pesados y formar complejos, esta capacidad permite

desempeñar funciones biológicas (29–31). A partir de estos conocimientos sobre las regiones que pueden ser modificadas y las que son necesarias para la acción farmacológica, se determinó la estructura mínima que debe tener la molécula para ser considerada un antibiótico, esta se denomina farmacóforo (29), Fig. 1.

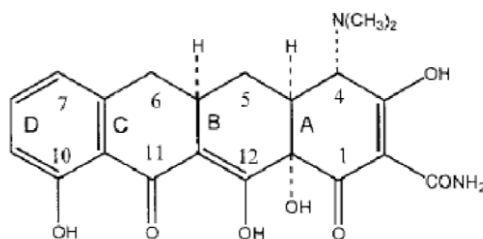


Fig. 1 Farmacóforo mínimo de la familia de tetraciclinas. Tomado de Thaker *et al.* 2010 (29).

### Mecanismo de acción de las tetraciclinas

El mecanismo de acción de las tetraciclinas se describió por primera vez en 1953, cuando se demostró que bloqueaban la síntesis de proteínas de *S. aureus* e inhibían el crecimiento celular de manera bacteriostática (32). Estudios posteriores confirmaron que las tetraciclinas atraviesan la membrana externa de bacterias entéricas principalmente a través de las proteínas de membrana externa OmpF y OmpC como complejos de coordinación de cationes cargados positivamente con  $Mg^{2+}$  (33,34). En el periplasma, la tetraciclina se disocia del magnesio permitiendo que la forma lipófila y no cargada se difunda a través de la membrana interna hacia el citoplasma (35). En el interior de la célula, las tetraciclinas vuelven a formar el complejo con  $Mg^{2+}$  y se unen a la subunidad ribosomal 30S, en la región del sitio aceptor (sitio A), bloqueando la unión de aminoacil-ARNt y como resultado inhibiendo la síntesis de proteínas (36). Por lo tanto, la unión al metal divalente es vital tanto para el suministro de antibióticos en la célula como para la unión al objetivo (29), Fig. 2.

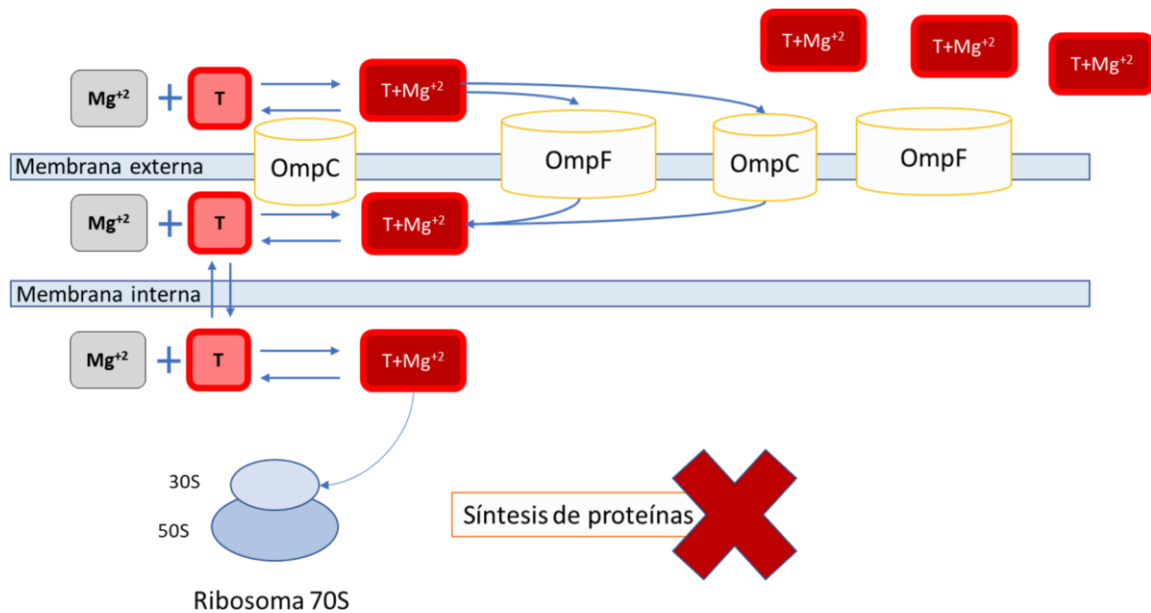


Fig. 2 Mecanismo de acción de la tetraciclina en bacterias Gram negativas. Elaboración propia.

### Resistencia a tetraciclina

Durante los últimos 70 años ha habido un uso generalizado de tetraciclina no solo con fines terapéuticos, sino también como promotor de crecimiento (37). El uso de antibióticos como promotores del crecimiento se ha relacionado con aspectos beneficiosos (especialmente el aumento en la eficiencia de la absorción de nutrientes y los ingresos comerciales para los agricultores), aunque hay datos que respaldan un aumento de resistencia bacteriana, reacciones alérgicas en humanos y animales, cambios en la microbiota ambiental, entre otros efectos perjudiciales (38,39).

#### ➤ Resistencia adquirida

Con respecto a la resistencia bacteriana, esta se puede clasificar como adquirida, cuando los microorganismos se han vuelto resistentes por medio de la adquisición de genes que codifican bombas de eflujo dependiente de energía (n=34 genes diferentes), proteínas que protegen a los ribosomas bacterianos (n=13 genes diferentes) o inactivan enzimáticamente las tetraciclinas (n=13 genes diferentes) (40).

#### Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo para tetraciclina, corresponden a proteínas de aproximadamente 46 kDa asociadas a la membrana que exportan tetraciclina fuera de la célula, por intercambio de un protón por un complejo de tetraciclina magnesio contra un gradiente de concentración (29); lo que reduce la concentración del fármaco intracelular y protege los ribosomas dentro de la célula (41). A nivel estructural, estas proteínas de eflujo que confieren resistencia a tetraciclina son parte de la superfamilia de facilitadores principales (MFS) y comparten similitudes de aminoácidos y estructura de proteínas con otras proteínas de eflujo involucradas en la resistencia a múltiples fármacos (42). Pueden identificarse dos grupos predominantes: el primero consiste en una proteína con

12 segmentos transmembranales organizados en los dominios  $\alpha$  y  $\beta$ , conectados por un bucle citoplasmático interdominio. Este grupo incluye principalmente a Tet(A), Tet(B) y Tet(G), las bombas de tetraciclina que se encuentran con más frecuencia en aislamientos de *Salmonella Typhimurium* (21). Las bombas del grupo 2 poseen 14 segmentos transmembranales e incluyen Tet(K) y Tet(L), que son las bombas de eflujo de tetraciclina más comunes en aislamientos clínicos Gram positivos. Las bombas asignadas a los grupos menores incluyen bombas que tienen menos prevalencia clínica (43).

La regulación de la expresión de estas proteínas a menudo está fuertemente acoplada a una proteína represora de la familia Tet(R). Cuando no hay presión selectiva con tetraciclina, las proteínas Tet(R) se unen a la región del operador corriente arriba de los genes que codifican las bombas de eflujo y regulan negativamente la expresión de estas. Sin embargo, cuando existe tetraciclina en el citoplasma, Tet(R) presenta mayor afinidad por este compuesto, lo que resulta en la disociación de la región del operador, permitiendo la síntesis de proteínas de bombas de eflujo (44), Fig. 3.

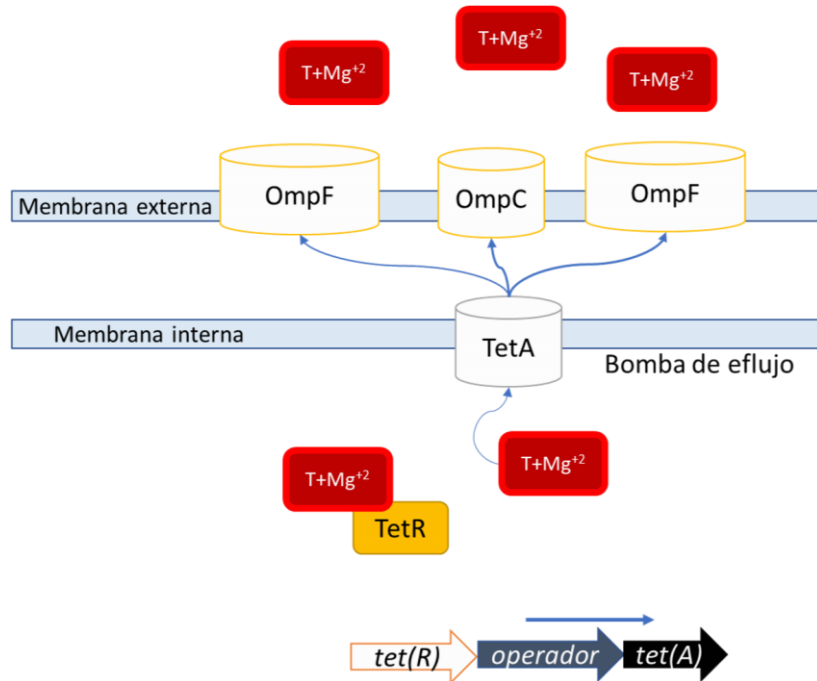


Fig. 3 Mecanismo de resistencia a tetraciclina a través de bombas de eflujo. Elaboración propia

#### Protección ribosomal

Las proteínas de protección ribosomal son proteínas citoplásmicas de aproximadamente 72.5 kDa que protegen al ribosoma de la acción de las tetraciclinas (45). También se encuentran en las bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero generalmente son más comunes en los organismos Gram positivos, y Tet(M) y Tet(O) son las proteínas más comunes (46).

La resistencia se logra cuando estas proteínas causan la alteración alostérica del sitio de unión primario al antibiótico, lo que conduce a la liberación de moléculas de tetraciclina unidas al ribosoma, de manera que la síntesis de proteínas puede continuar (47). Por este mecanismo, exhiben resistencia contra las tetraciclinas tanto de primera como de segunda generación, pero no a los compuestos de tercera generación (48). De hecho, se ha demostrado que la tigeciclina exhibe efectivamente una actividad antibacteriana contra los ribosomas protegidos con Tet(M), y los modelos recientes de microscopía crioelectrónica sugieren que la tigeciclina es capaz de permanecer unida al ARNr 16S en presencia de Tet(M), porque su cadena lateral C-9 se superpone al sitio de unión Tet(M) en el ribosoma

(49).

### Inactivación enzimática

El tercer mecanismo de resistencia a la tetraciclina implica la inactivación enzimática del fármaco. Tet (X) es la enzima modificadora de tetraciclina más estudiada y es activa contra todas las clases de tetraciclinas, incluida la tigeciclina

(50). Esta enzima es una oxidoreductasa que en condiciones aeróbicas utiliza NADPH en presencia de magnesio y convierte la tigeciclina en 11a-

hidroxitigeciclina; la molécula modificada tiene una unión más débil al magnesio, que es esencial para su unión al ribosoma (29,30).

Además, la presencia de Tet (X) y otras enzimas inactivadoras de tetraciclina similares, también conocidas como "destructasas de tetraciclina", se han encontrado en bacterias agrícolas y acuícolas garantizando la persistencia de este mecanismo de resistencia en la cadena alimentaria y facilitando la transmisión a patógenos humanos (51).

Muchos de los genes que determinan los mecanismos de resistencia anteriormente mencionados están asociados con plásmidos y transposones, los cuales son elementos móviles que pueden influir en su distribución entre varios géneros (46). Los plásmidos son ADN circulares de doble cadena que se replican de forma autónoma en una célula huésped, a través de genes de iniciación y control de replicación, y pueden variar su longitud en pares kb dependiendo de la cantidad de genes que albergan (52). Entre los plásmidos existe una clasificación denominada grupo de incompatibilidad (Inc), la cual se caracteriza por denominar plásmidos incompatibles a aquellos que expresan el mismo control de replicación y no pueden coexistir en la misma bacteria, mientras que plásmidos con diferentes controles de replicación se denominan como compatibles y si pueden encontrarse de manera simultánea en la misma bacteria (52). Los grupos de incompatibilidad más reportados en enterobacterias y relacionados con resistencia a antibióticos son: IncF, IncA/C, IncL/M, IncI2, IncHI2 e IncN

(53). La importancia de conocer los plásmidos radica en que pueden transmitirse de manera horizontal a través de un pili codificado por el propio plásmido, implicando transferencia de ADN entre diferentes géneros de bacterias que puede incluir genes que otorgan resistencia a antibióticos; este mecanismo se denomina conjugación (54).

Recientemente, este mecanismo se ha encontrado en otro tipo de elemento móvil denominado transposón (55). Los transposones son secuencias de ADN, conjugativos o no conjugativos, que contienen un gen denominado transposasa (también llamado integrasa o recombinasa) y pueden contener otros genes (por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos) flanqueados por repeticiones invertidas en ambos extremos, que sirven como sitios de recombinación (56).

Estos elementos pueden saltar a una nueva ubicación genómica utilizando dos mecanismos de transposición (57): uno se conoce como transposición conservadora, donde el elemento transponible se mueve de un sitio de ADN (sitio original) a otro sitio (sitio de destino) sin replicarse, los transposones característicos de este mecanismo son Tn5 y Tn10 (58); el otro modo de transposición se conoce como transposición replicativa, donde el elemento transponible primero se replica para formar dos copias en una estructura denominada cointegrado: una copia permanece en el sitio original, mientras que la otra copia se inserta en un sitio nuevo (destino), este mecanismo es característico del Tn3 y del Tn1721 (59), Fig. 4.

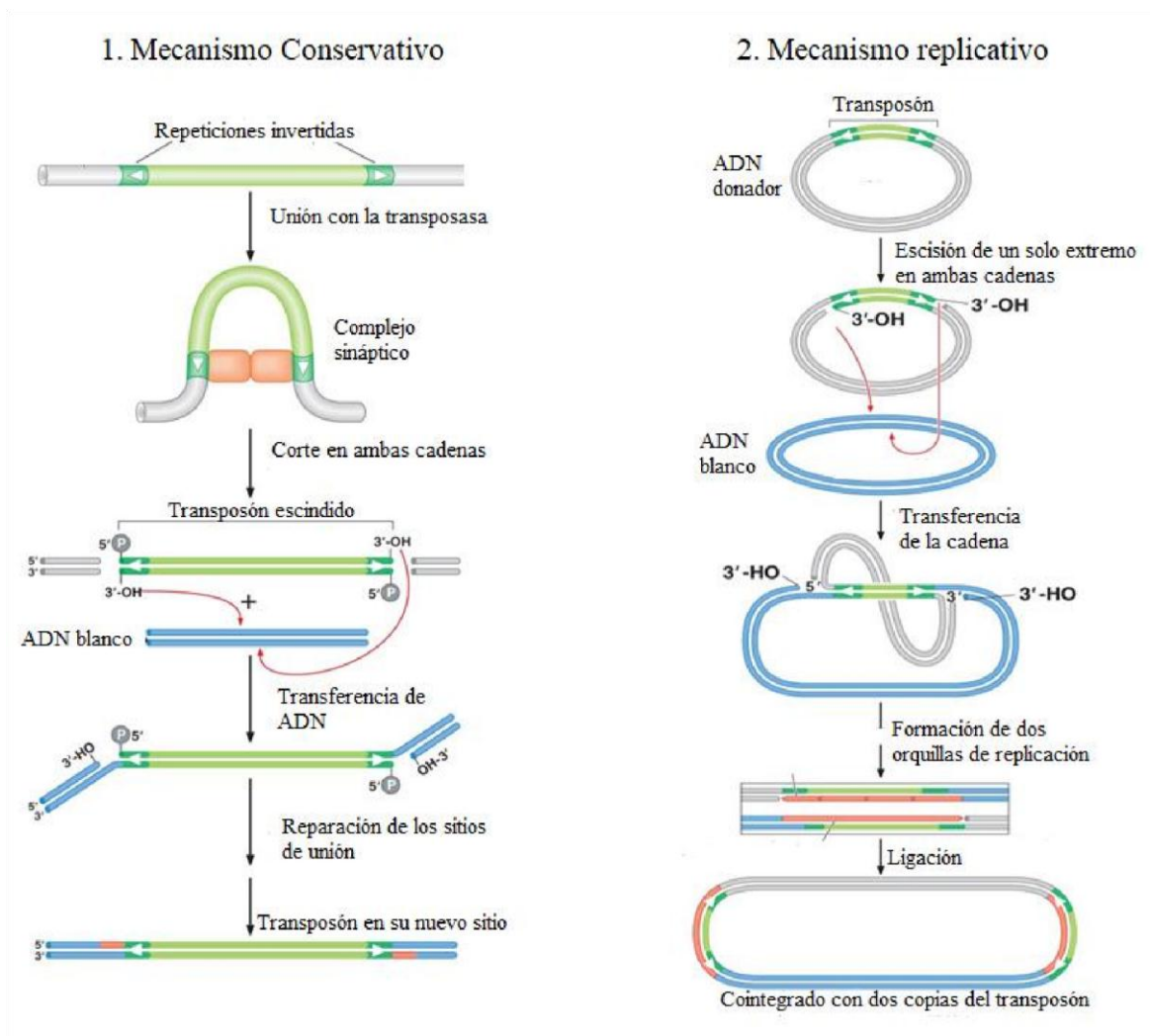


Fig. 4 Mecanismos de movilización de los transposones. Modificado de Campbell et al. 2008 (60)

Otra plataforma de genes de resistencia que ha sido reportada como transmisible por conjugación es la isla genómica de *Salmonella* tipo 1 (SGI-1) (61), la cual es un fragmento de ADN cromosomal movilizable de 43 kilo bases (kb) (62,63) con una región de 13 kb que alberga determinantes de resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamida y tetraciclina (62,64)

➤ Resistencia adquirida



Tal vez un poco menos estudiada es la resistencia intrínseca de la bacteria, en donde la membrana externa de las bacterias Gram negativas desempeña un papel crucial de proporcionar una capa extra de protección al organismo sin evitar el intercambio de iones y moléculas necesarias para mantener la vida (65). Al combinar una bicapa lipídica altamente hidrofóbica que contiene canales proteicos con propiedades específicas de exclusión por tamaño, la membrana externa actúa como una barrera selectiva y tiene un impacto importante en la susceptibilidad del microorganismo a los antibióticos (66,67).

En *E. coli* la permeabilidad de la membrana externa está regulada por el equilibrio de las porinas y las dos proteínas principales de la membrana externa (OMP) son OmpC y OmpF, que constan de tres barriles  $\beta$  de 16 cadenas que definen un poro transmembrana (68), su nivel de expresión se ajusta cuando es necesario minimizar la penetración de compuestos nocivos o maximizar el acceso a nutrientes (34,69). Este nivel de expresión se regula transcripcionalmente por un sistema de transducción de señales de dos componentes que consiste en las proteínas OmpR y EnvZ (70), y se ha demostrado experimentalmente que OmpF tiene un tamaño de poro más grande que OmpC (71). En comparación, *Salmonella Typhimurium* LT2 produce unas proteínas casi idénticas a OmpC y OmpF de *E. coli* (72), y otra proteína de membrana externa denominada OmpD, que ha sido reportada como la proteína de membrana externa más abundante en el serovar Typhimurium (73), pero de la cual solo existe un reporte sobre su implicancia con la resistencia a antibióticos, específicamente a quinolonas (74).

## Estado del Arte

El serovar Typhimurium de *S. enterica* es una de las causas más frecuentes de salmonelosis humana alrededor del mundo (17) . De 1966 al 2010 en Europa, se distinguieron variantes relacionadas a su sensibilidad a bacteriófagos, denominadas fagotipos, las cuales fueron: *Salmonella* Typhimurium DT9, DT204, DT104 y DT193, éstas emergieron sucesivamente como cepas resistentes a múltiples fármacos (22). De todos estos fagotipos, la variante DT104 cobraría importancia en la década de 1980 por adquirir multirresistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamida y tetraciclina (ACSSuT) (64). A partir de los años noventa los principales países afectados por *Salmonella* Typhimurium DT104 fueron Reino Unido, Dinamarca y Estados Unidos, para posteriormente diseminarse alrededor del mundo (75). Actualmente, desde hace unos diez años se vienen incrementando los casos clínicos relacionados a una variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium con la fórmula antigénica 1,4, [5], 12: i: - de la cual aún no se conoce su origen (76), pero se estima que se disemina principalmente a través de fuentes alimentarias (77,78).

En Estados Unidos, los brotes de *Salmonella* suelen estar relacionados con una fuente de alimento; sin embargo, el contacto con animales vivos también puede provocar brotes de enfermedades humanas. Recientemente se analizaron los brotes entre los años 2009 al 2014 y determinaron que 79.5% resultaron de la transmisión de alimentos y 20.5% resultaron de la transmisión por contacto con animales (79). Con relación a los aislamientos de animales, en Escocia se analizaron muestras recolectadas entre 2003 y 2014 encontrando una alta diversidad de multidrogorresistencia en aislamientos de cerdos (80). Reportes retrospectivos en Europa con aislamientos de la década de 1980 ya visualizaban una tendencia de aumento de multidrogorresistencia (22,81).

Con respecto a las publicaciones en Latinoamérica, en México se analizaron 243 aislamientos multirresistentes de *Salmonella enterica* provenientes alimentos y aislados clínicos. La frecuencia de mayor resistencia obtenida fue a tetraciclina (41.6%), seguida de ampicilina (24.7%) y ácido nalidíxico (21.8%) (82). Resultados similares se obtuvieron producto de un

estudio en Brasil, donde cepas del serovar Typhimurium. aisladas de pacientes hospitalizados fueron 65% resistentes a tetraciclina (83). En Colombia, aislamientos clínicos del mismo serovar analizados entre los años 2005 al 2011 reportaron un 81.7% de resistencia a tetraciclina seguido de 44.1% a ampicilina (84). Este aumento del porcentaje de resistencia a tetraciclina, con respecto a los anteriores países mencionados, aún no ha sido fundamentado. Sin embargo, un estudio basándose en sus datos sugiere que la resistencia antimicrobiana a tetraciclina, estreptomicina y cloranfenicol es muy común entre los aislados de *Salmonella* spp. debido a un uso prolongado y frecuente de estos antimicrobianos en la producción animal (85).

Formalmente el origen de la resistencia a antibióticos aún está en debate, pero se está considerando como principales razones el uso excesivo en humanos más la utilización indiscriminada en animales con fines terapéuticos, profilácticos, que promueven el crecimiento y mejoran la eficacia de los alimentos (37). Ante esta preocupación, la Unión Europea prohibió a principios de los años 70 (Directiva EC 70/524) la aplicación subterapéutica de tetraciclinas y otros antibióticos a los animales de granja (30). En Estados Unidos, la realidad fue muy distinta porque no se adoptó ninguna prohibición hasta inicios del 2017 (86). Probablemente debido a esta falta de coordinación entre las potencias mundiales y sumado a la globalización, sigue siendo significativamente importante la incidencia de resistencia a tetraciclina documentada en el brote internacional de infecciones por *Salmonella* Typhimurium ocurrido entre los años 2008 al 2010 en los Estados Unidos, Reino Unido y Canadá (3).

En Colombia, los antibióticos como promotores de crecimientos se empezaron a emplear desde los años 70 y en la resolución 1326 de 1981, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) se declaró como único organismo que se reserva el derecho de autorizar su utilización. Más tarde en la resolución 1966 de 1984 se dispuso no aceptar como promotores de crecimiento sustancias antimicrobianas que se utilicen para fines terapéuticos en humanos

(87). Hasta el momento no se ha publicado una lista de los antibióticos permitidos, sin embargo, en la resolución 1382 del 2013 se identifica tetraciclinas de primera y segunda generación como agentes antimicrobianos más no como promotores de crecimiento (88).

A nivel mundial, con respecto al incremento de la incidencia de resistencia bacteriana a tetraciclinas de primera generación, se desarrollaron antibióticos de segunda y tercera generación, los cuales son compuestos semisintéticos, es decir, las moléculas orgánicas naturales han sido manipuladas para aumentar la acción farmacológica y reducir la toxicidad (29,36). Los compuestos de segunda generación más utilizados en la clínica es la doxiciclina y la minociclina, ambas aprobadas por la FDA en 1967 y 1971, respectivamente (24,89,90). Más recientemente en el año 2005 la FDA aprobó el uso del primer antibiótico de tercera generación, también llamados glicilciclinas, denominado tigeciclina y fue diseñado para enfrentar a los microorganismos resistentes a los anteriores compuestos (90). Actualmente, en el año 2018 la FDA aprobó tres nuevos compuestos denominados omadaciclina, sareciclina y eravaciclina; este último es el único indicado para infecciones intraabdominales (91). En Colombia, se viene utilizando tigeciclina contra *Salmonella* spp. y hasta el momento no se ha reportado resistencia (92,93).

En lo relacionado con resistencia a tetraciclina adquirida, en el 2007 se desarrolló un estudio para evaluar la predominancia de los genes de la familia *tet* en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* provenientes de todas las regiones del mundo. Los resultados que obtuvieron demuestran que *tet(A)* y *tet(B)* están mayoritariamente presentes a nivel mundial, pero dependiendo de la región uno es más predominante que otro. Según esta publicación en Latinoamérica es predominante *tet(B)*(94). Y aunque en ese estudio no se encontró *tet(G)*, en *Salmonella* spp. sí se presenta con mayor frecuencia e inclusive es característico que las cepas que portan este gen tengan valores MIC en promedio de 64 ug/ml, mucho menor que el promedio de los otros genes *tet* que es 256 ug/ml (95,96).

Como se había mencionado anteriormente, estos genes se movilizan a través de elementos conjugativos tales como plásmidos. Los grupos de incompatibilidad plasmídicos más

abundantes en enterobacterias que portan regiones de multirresistencia son: IncHI1, IncHI2, IncF e IncA/C (53,97–100).

En un estudio de caracterización plasmídica en aislamientos de *Salmonella* se encontró que el serovar Typhimurium, a diferencia de otros serovares, poseía un bajo porcentaje IncA/C (101). Otra investigación llegó a la conclusión que algunas cepas pueden haber llevado el plásmido una vez, pero que los genes de resistencia se transfirieron al cromosoma con la subsiguiente pérdida del plásmido (98). Existe un reporte que indica pérdida del mecanismo de conjugación de los plásmidos IncA/C, y necesidad de requerir de la maquinaria de un plásmido IncX1 para su movilización (102), estas publicaciones confirman que la plataforma es capaz de integrarse a otras secuencias de ADN. Además, se ha publicado una asociación entre los transposones Tn1721 con plásmidos IncA/C e IncQ1 (103). Característicamente, el gen de resistencia a tetraciclina *tet(A)*, que codifica una proteína de flujo asociada a la membrana, se encuentra inserto en este tipo de transposón replicativo no conjugativo de 11.1 kb (104).

Otro tipo de elemento móvil relacionado a *Salmonella* es un plásmido grande de bajo número de copias que contiene genes de virulencia. Los plásmidos de virulencia de *Salmonella* son heterogéneos en tamaño (50–90 kb), pero todos comparten una región de 7.8 kb denominada operón *spv* (105). El plásmido de virulencia del serovar Typhimurium (pSVT) LT2 tiene un tamaño de 90 kb, pertenece al grupo de incompatibilidad IncF y es auto transmissible (106). Existe evidencia de que los genes *spv* permiten que la bacteria infecte el bazo y el hígado al aumentar la tasa de replicación bacteriana dentro de las células huésped en ratones (107). Sin embargo, aún hay mucha discrepancia sobre si aumenta la virulencia en humanos (108), pero de lo que sí hay certeza es que se ha reportado que este tipo de plásmido se ha integrado con regiones multirresistentes que albergan el gen *tet(B)* (109,110). Este gen de resistencia a tetraciclina se ha encontrado vinculado al transposón Tn10, el cual es una plataforma conservativa que está flanqueada por repeticiones invertidas de elementos IS10 (111). Este transposón ha sido reportado en el plásmido R27 del grupo de incompatibilidad IncHI1 (112).

Un caso particular es la isla genómica de *Salmonella* tipo I (SGI-1), la cual es un elemento integrado en el cromosoma bacteriano que posee una región multirresistente de 13 kb que porta los genes *floR* y *tet(G)* flanqueados por dos integrones tipo 1 (IntI-1), donde uno de los IntI-1 contiene el gen *pseI* con un peso molecular de 1 200 pb, y el otro porta un gen *aadA2* de aproximadamente 1 000 pb (62,63). La sumatoria de los genes de resistencia encontrados en esta isla genómica es característica del fenotipo de pentarresistencia tipo ACSSuT, el cual está asociado al fagotipo DT104 de Typhimurium (113). Hasta el momento, se han identificado variantes de SGI1 en otros serovares de la subespecie *enterica* tales como Agona, Albany, Derby, Infantis, Newport y Paratyphi B (114), y se relacionan con mayor virulencia y diseminación de la bacteria (115). Una investigación sobre la isla demostró a través de un árbol filogenético de muestras DT104 provenientes de Escocia que las variaciones de SGI1 pueden agruparse a través de clados (116). Las variantes de la isla genómica se codifican con letras de la A a la Z. Por ejemplo, una variante de la SGI-1 en el serovar Albania, que se caracteriza por reemplazar el gen de resistencia a estreptomicina por el de resistencia a trimetoprim en el casete de genes de un IntI-1, se denomina SGI1-F (117).

Los genes de resistencia de la familia *tet* relacionados a bombas de eflujo son capaces de expresar proteínas con afinidad diferencial a diferentes tipos de tetraciclinas. Se ha reportado que las bombas Tet(A), Tet(B) y Tet(K) son capaces de expulsar tetraciclina, minociclina y doxiciclina a diferentes grados. Recientemente, una nueva clase de tetraciclinas de tercera generación o glicilciclinas han demostrado ser activas contra las cepas que portan genes de bombas de eflujo. Sin embargo, un experimento posterior demostró que la sobreexpresión de Tet(B) efectivamente no logra expulsar este antibiótico, pero la de Tet(A) es dependiente de la concentración (118). Además, se ha encontrado que dos aislamientos veterinarios de *Salmonella*, una cepa de *S. Cholerasuis* y otra de *S. Typhimurium* que portaban una variante de resistencia a tetraciclina de la clase *tet(A)*, eran menos susceptibles a las glicilciclinas. Esta variante genética llevaba mutaciones en el bucle citoplásmico más grande de la bomba de flujo de salida, lo que provocó un cambio de aminoácidos de serina, fenilalanina y valina por alanina, serina y fenilalanina, respectivamente en los codones 201, 202 y 203. Esta región interdominio de la bomba de eflujo generalmente se consideraba como no funcional en el

flujo de salida de la tetraciclina, pero el cambio de aminoácidos es probablemente el responsable de una mayor resistencia (119). Otro estudio determinó que las cepas que portaban TetA(A) con las siguientes mutaciones: S251A e I248L; aumentaban la resistencia a tigeciclina, pero disminuían la resistencia a tetraciclina, doxiciclina y minociclina. Estos resultados sugieren que es posible lograr un aumento significativo en la resistencia a las gliciliclinas acumulando mutaciones, pero estos cambios en la estructura de la proteína también pueden conducir a una disminución en la eficiencia del transporte de clases anteriores de antibióticos de tetraciclina (120).

Con respecto a los estudios relacionados con resistencia intrínseca, en 1980 se realizó un primer análisis proteómico para diferenciar proteínas de membrana externa entre *Escherichia coli* K12 y *Salmonella* Typhimurium LT2. Los resultados obtenidos demostraron alta similitud de las proteínas OmpC y OmpF en términos de función, regulación de la expresión y equivalencia de los loci genéticos que determinan su producción. Sin embargo, no mostraron ninguna similitud en términos de migración en geles de poliacrilamida (72). Además, la cepa LTS presenta una porina adicional denominada OmpD, la cual se conoce que junto con YddG probablemente comprenden una bomba de flujo de salida para la salida del compuesto tóxico metil viologen (121).

Las porinas OmpC y OmpF han demostrado presentar variaciones en su expresión dependiente de antibióticos. Se ha encontrado que la falta de OmpF, pero no de OmpC, incrementa significativamente los valores de MIC a los antibióticos como beta-lactámicos, ampicilina y cefoxitina, así como a nitrofurantoína (122). Así como también que una reducción en OmpC probablemente indique resistencia a carbapenem (123). En el caso puntual de resistencia a la familia de tetraciclina, estudios en *Escherichia coli* K12 han reportado una reducción de tanto OmpC como OmpF (33,124). Adicionalmente, un estudio que tuvo como objetivo caracterizar la importancia de OmpC en la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia bacteriana en *E. coli*, concluyó que esta porina es un inmunógeno en los humanos y una pérdida o disminución de OmpC en la bacteria la

convertiría no solo resistente a ciertos antibióticos sino también al efecto bactericida del suero mediado por la vía del complemento (125).

Además de las porinas de membrana externa, también se ha demostrado que es posible inducir resistencia a tetraciclina (TET) en *Escherichia coli* K12 susceptible mediante un aumento gradual en la exposición al antibiótico, y que esta resistencia intrínseca está relacionada con el aumento de la expresión de las bombas de eflujo tipo AcrAB (126).

Finalmente, hay estudios en enterobacterias que al evaluar la relación entre clonalidad y los determinantes de resistencia a tetraciclina llegan a la conclusión que no existe relación clonal y que la diseminación de estos genes es principalmente a través de transferencia horizontal (127,128). Lo que implicaría que la alta prevalencia resistencia a tetraciclina puede deberse a la presión selectiva, así como a la alta transferibilidad de los determinantes tet (30,128). En Colombia, se han realizado análisis de perfiles electroforéticos de PFGE en *Salmonella* Typhimurium, donde se determinó que el patrón COINJPXX01.0001 se mantuvo como predominante en el país desde 1998 hasta 2011, a excepción del periodo entre 2002 y 2004, en el que fue reemplazado por el COINJPXX01.0062 (129). Sin embargo, aún no se ha evaluado si existe clonalidad con los determinantes de resistencia.

## Planteamiento del problema

Las salmonelas no tifoideas (NTS, por sus siglas en inglés) son uno de los mayores causantes de enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos a nivel mundial (1). En un análisis prospectivo del año 2010, determinaron que el impacto global en la salud humana de *Salmonella* no tifoidea tiene un estimado de 93.8 millones de infecciones, de las cuales se estima que 80.3 millones son transmitidas por alimentos, y generan 155,000 muertes cada



año (1). Además, estas bacterias se encuentran dentro de la lista prioritaria de la OMS debido al desarrollo y dispersión de multirresistencia a antibióticos (130). Con respecto a esto último,

la resistencia a tetraciclina en Europa ha sido reportada desde mediados de los años 60 (18) y se ha mantenido a lo largo de las décadas posteriores (22). En Estados Unidos ha ocurrido una situación similar (81,131).

Diversos estudios basados en biología molecular y proteómica han identificado que no todos los determinantes de resistencia a tetraciclina confieren la misma actividad bactericida ante tetraciclinas de primera, segunda o tercera generación (95,118,119,132). Por lo que, en todas las publicaciones recientes de multiresistencia que incluyan este antibiótico siempre se identifica el gen determinante (133,134), y en muchos casos el elemento móvil en el que está inserto (104,111,135). Estos datos son necesarios para conocer y predecir las futuras resistencias bajo un enfoque de epidemiología molecular (136).

En Colombia, aislamientos de *Salmonella* Typhimurium resistentes a tetraciclina se han reportado tanto a nivel alimentario, ambiental y clínico (84,137,138). En esta última categoría, la vigilancia clínica de EDAs realizada por el Instituto Nacional de Salud (INS) publicó que el serovar Typhimurium es uno de los principales causantes de salmonelosis, y cuenta con resistencia a tetraciclina en un 80% de los casos (84,139). Sin embargo, esta resistencia se ha realizado únicamente mediante métodos fenotípicos más no a nivel molecular.

Ante estos antecedentes, se consideró necesario analizar los aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium resistentes a tetraciclina provenientes del programa de vigilancia del INS. Con estos resultados, se espera poder explicar el determinante genético de resistencia adquirida predominante, así como dar alcances sobre su diseminación. Además de tener una perspectiva inicial sobre los cambios intrínsecos que pueden ocurrir ante la presión selectiva con este antibiótico.

## Hipótesis o pregunta de investigación

La resistencia a tetraciclina es dependiente de un gen de alta diseminación relacionado a un elemento móvil en *Salmonella* Typhimurium.

## Objetivo General

Caracterizar la resistencia a tetraciclina en aislamientos clínicos colombianos de *Salmonella* Typhimurium provenientes de la vigilancia de enfermedad diarreica aguda (EDA).

## Objetivos Específicos

1. Identificar los genes de resistencia a tetraciclina en aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium mediante PCR y WGS.
2. Describir los elementos genéticos móviles relacionados a cada determinante de resistencia.
3. Analizar la expresión de proteínas de membrana externa en respuesta a estrés por tetraciclina.

## MÉTODOS

### Diseño metodológico y muestra

El presente trabajo fue una investigación analítica y experimental con un enfoque retrospectivo de corte transversal, donde se evaluaron aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium recuperados del programa de vigilancia de enfermedad diarreica aguda (EDA)

del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud en Colombia, entre el periodo de 1997 al 2016 provenientes de materia fecal y hemocultivo. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- El agente causante de la enfermedad fue *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
- Los aislamientos provenían de materia fecal o hemocultivo.
- Presentaron un perfil de resistencia que incluía tetraciclina.

La población de aislamientos recuperados de *Salmonella* por el programa de vigilancia suma 11 203 cepas, de las cuales 3 330 son *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Para este trabajo se escogió por conveniencia un tamaño muestral de 150 aislamientos de los cuales 47 provenían de materia fecal y 103 de hemocultivo.

El procesamiento de las muestras fue realizado por medio de PCR convencional (n=50) en el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud de Colombia y por secuencia de genoma completo (WGS) (n=100) con la colaboración de la Universidad de Liverpool.

### Extracción y purificación de ADN total

Los aislamientos que fueron procesados por PCR convencional fueron previamente tratados para obtener el ADN total con el cual se hizo el análisis molecular de los genes de resistencia.

Para extraer el ADN total por el método de calentamiento o 'boiling', primero se crecieron los aislamientos en medio de cultivo líquido LB a 37°C por 24 horas; después, en un eppendorf se inocularon 50 µl del crecimiento bacteriano en 1 ml de medio LB y se incubó por 2 horas. Para recuperar la masa celular se centrifugó a 5 000 gravedad por 2 minutos. El pellet fue resuspendido en Tris HCl 10mM pH 7, y se colocó en una plancha de calentamiento a 95°C por 15 minutos. Luego del tiempo establecido se retiraron los tubos del calor y se centrifugaron por pulso manual hasta observarse un precipitado correspondiente al debris celular. Finalmente, se recuperó el sobrenadante que contenía el ADN total y se cuantificó por espectrofotometría UV/visible en un equipo NanoDrop™ 2000/2000c (Thermos) (140), considerando como valor de pureza una relación de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2.

## Detección y amplificación de genes que otorgan resistencia a tetraciclina

Se determinaron los principales genes de resistencia a tetraciclina en *Salmonella* Typhimurium (*tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)*) utilizando la técnica PCR convencional seguida de una visualización del producto amplificado en geles de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio a una concentración final de aproximadamente 0.2-0.5 µg / mL. Los oligonucleótidos empleados en esta técnica y las condiciones para cada reacción previamente ya han sido reportados en la literatura (141) y se encuentran resumidos en anexos 1, 2 y 3 respectivamente.

Además, considerando que el gen *tet(G)* está muy relacionado con la SGI-1, la cual también cuenta con dos integrones tipo 1; a las cepas positivas a este gen también se les evaluó la presencia del gen *intII*, el casete de genes de la región variable, el gen *qacEΔ1* y el gen *sull* para determinar la presencia de un integrón completo; más las regiones flanqueantes de la SGI-1, denominadas ‘Left junction’ (L-junction) y ‘Right junction’ (R-junction). Los oligonucleótidos utilizados para estas reacciones ya han sido reportados anteriormente (62) y el resumen de las condiciones de amplificación se encuentran en los anexos 4 y 5.

## Sensibilidad a tetraciclina

Si bien las cepas ya habían sido confirmadas de manera rutinaria como resistentes a tetraciclina a través de ensayos cualitativos de Kirby Bauer por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, no se tenían datos a nivel cuantitativo de resistencia; por lo que, para confirmar la susceptibilidad a tetraciclina se realizaron MICs a 10 aislamientos que portaban aleatoriamente *tet(A)*, *tet(B)* o *tet(G)* según los criterios del CLSI 2017 (142) utilizando como control positivo *Escherichia coli* ATCC 25922. Inicialmente las cepas fueron inoculadas en cajas de agar BHI con tetraciclina (12µg/ml) a 37°C por 24 horas y se les realizó un pase adicional en otra caja de BHI con antibiótico bajo las mismas condiciones. Luego, se sensibilizó la placa con las siguientes concentraciones de tetraciclina (Sigma, referencia:87128) en un volumen de 50 µl: 0.125, 0.25, 0.5,

1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml. Posteriormente, las cepas fueron inoculadas en caldo Müller-Hinton a una concentración 0.5 McFarland (0.08-1 absorbancia a una longitud de onda de 625nm), y después se les realizó una dilución 1/100 con el mismo caldo para luego inocular 50 µl en la placa ya sensibilizada con antibiótico. Los resultados se leyeron entre las 16 y 18 horas posteriores. El crecimiento bacteriano se evidenció por visualización de turbidez en los pozos.

### Perfil plasmídico

Teniendo como antecedente que la mayoría de los aislamientos multirresistentes de *Salmonella* spp. portan un gran número de plásmidos (53,98,143), fueron seleccionados aleatoriamente 19 aislamientos que portaban *tet(A)*, *tet(B)* o *tet(G)* y se procedió a determinar su perfil plasmídico: para lo cual, fueron sometidos a la técnica de lisis alcalina descrita por Kieser *et al.* 1984 (144) con algunas modificaciones. Inicialmente se cultivaron los aislamientos overnight a 37°C en medio líquido LB (10ml). Después se centrifugó a 10 000 rpm por 3 minutos y se recuperó el pellet. Para obtener la ruptura de la pared celular, el pellet fue resuspendido en 600 µl de solución I (anexo 6) en un eppendorf (1.5 ml) y se mezcló en vortex. Se adicionó 150 µl de lisozima (10mg/ml) y se mezcló suavemente por inversión para luego incubarlo en hielo por 30 minutos. Para conseguir la lisis de la membrana celular, se adicionó 300 µl de solución II, (anexo 6), se mezcló por inversión y se dejó incubando 30 minutos a 55°C para después enfriarlo a 4°C por 5 minutos. En esta etapa ya se ha liberado el ADN plasmídico; sin embargo, en la solución también se encuentran complejos proteicos. Para precipitar estos complejos y limpiar el ADN, se agregó 150 µl de fenol-cloroformol alcohol isoamílico (Sigma, referencia: P3803) y se mezcló de manera manual hasta conseguir que la solución vire a un color blanco lechoso. Finalmente se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C por 20 minutos y se extrajo el sobrenadante para almacenarlo en un nuevo tubo eppendorf. Para poder visualizar el ADN plasmídico se cargaron 40 µl del recuperado en un gel de agarosa al 0.8% con Buffer TAE 0.5X y se dejó correr por 3-4 horas a 90v con buffer frío.

Adicionalmente, de manera similar a la detección de los genes de resistencia a tetraciclina se empleó la técnica PCR convencional más visualización de los productos en gel de agarosa para conocer los principales grupos de incompatibilidad plasmídicos presentes en los aislamientos: Inc A/C, IncX1, IncFII, IncHI1 e IncHI2. Las condiciones de reacción de PCR fueron resumidas en los anexos 7, 8, 9, 10 y 11 respectivamente (145–147).

## Análisis de las secuencias obtenidas por WGS

En colaboración con el Proyecto 10 000 Genomas de Salmonella de la Universidad de Liverpool se secuenció bajo la tecnología Illumina (148) 100 aislamientos de *Salmonella* Typhimurium provenientes de hemocultivo. La extracción de ADN y la secuenciación del genoma completo se llevaron a cabo en el Instituto Earlham, Norwich, Reino Unido. El ADN se extrajo de 100 µl de cultivo bacteriano liberado con calor usando el kit MagAttract (Qiagen). Las bibliotecas de secuenciación se construyeron utilizando 1 ng de entrada de ADN con un kit Nextera modificado (Illumina). Las bibliotecas amplificadas por PCR se normalizaron y seleccionaron el tamaño antes de la secuenciación en un Illumina HiSeq4000, con una métrica de lectura de 2x150 pb y una cobertura mediana del genoma de 30x. Las secuencias adaptadoras de las lecturas brutas de Illumina se recortaron utilizando Trimmomatic v0.36 en modo palíndromo (ILLUMINACLIP: 2: 30: 10). El ajuste de la calidad fue realizado por Seqtk v1.2-r94 usando el algoritmo Phred. El ensamblaje del genoma se realizó con Unicycler v0.4.4 con final pareado y lecturas no pareadas. La calidad de los ensamblajes se evaluó según la referencia Quast v4.6.3. Un fago y el plásmido *Salmonella* Typhimurium 4/74 genoma libre (GenBank ID: CP002487) se usó como referencia rápida para excluir el impacto de las regiones variables del genoma en la evaluación de la calidad. Se evaluaron el valor de N50 y el número de contigs. El valor N50 de todos los ensamblajes fue > 15 kb, y el número de contigs fue <600 (149).

Para analizar las secuencias se utilizó la plataforma web bioinformática PATRIC 3.5.31 (<https://patricbrc.org/>), y a través de la herramienta 'Features', la cual muestra todas las características genómicas anotadas por PATRIC (gen, CDS, ARNm, etc.) se realizó la

búsqueda de los genes de resistencia de la familia *tet* e identificación de los contigs que los contenían. Estos resultados se compararon con las principales bases de datos de genes de resistencia a antibióticos como CARD y NDARO a través de la herramienta ‘Speciality Genes’ de la misma plataforma, y con lo publicado por la Ph.D. Marilyn Roberts de la Universidad de Washington, especialista en resistencia a tetraciclina <http://faculty.washington.edu/marilynr/>.

En el programa Geneious 7.1.3 se abrieron las secuencias en formato fasta y se escogieron los contigs identificados anteriormente. En este mismo programa, se alinearon estas secuencias tomando como referencia el tipo de gen de la familia *tet* que portaba. Posteriormente, para identificar el entorno genómico, los grupos de secuencia consenso obtenidos fueron alineados en la plataforma BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Además, para identificar los grupos de incompatibilidad se utilizó la plataforma web PlasmidFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder-2.0/>) según es recomendado por Carattoli *et al.* 2014 (150).

### Análisis de la expresión de proteínas de membrana externa (OMPs).

Una vez que ya se determinó el componente genético que otorga resistencia adquirida a tetraciclina, se evaluó si existe un cambio de expresión de proteínas de membrana externa como resistencia intrínseca de la bacteria. Para lo cual se escogieron 6 aislamientos representativos, los cuales fueron por gen de la familia *tet* y procedencia clínica. Cada aislamiento fue cultivado en 15 ml de medio LB con tetraciclina a la concentración inmediata menor del MIC y en medio LB sin antibiótico. Ambos cultivos crecieron hasta una absorbancia de 0.6 con una densidad óptica de 600 nm, según Puente *et al.* 1995 (151), para luego ser cosechados y centrifugados a 5 000 gravedad por 10 minutos. Posteriormente, las células se resuspendieron en 500 µl de buffer 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2 y sonicadas en hielo hasta que las suspensiones estuvieron claras y sin residuos. Los restos celulares y las células



intactas fueron eliminados por centrifugación a 15 000 gravedad por 2 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos de microcentrífuga y después de una centrifugación a 12000 gravedad durante 1 hora a 4°C se recuperaron las fracciones de la membrana. Para eliminar restos lipídicos y proteínas de membrana interna se resuspendió el pellet en 500 µl de buffer 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2, con 2% de Tritón X-100 durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 12 000 gravedad durante 1 hora a 4°C. La fracción insoluble de la membrana externa se lavó con 500 µl de 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2 y se centrifugó a 12 000 gravedad durante 1 hora a 4°C para finalmente resuspender el pellet en 50 µl de PBS 1X pH 7.4, según Villarreal *et al.* 2014 (152).

Para determinar las concentraciones de las OMPs, primero se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) con el ensayo de Bradford donde 5 µl de proteína fueron mezcladas con 250 µl del reactivo Bradford (Sigma Ref: B6916) y se dejó incubar mínimo 10 minutos antes de proceder a la lectura en un lector de ELISA a una densidad óptica de 595 nm. Los datos fueron procesados en GraphPad Prism 7 para correlacionar la absorbancia obtenida con la concentración de proteína. Una vez obtenida la curva estándar de BSA se procedió a medir las OMPs extraídas y se extrapolaron los datos para obtener la concentración aproximada. Después, 12 µg de cada muestra se mezclaron con buffer de carga para proteínas 4x (con Mercaptoetanol al 5%), y después se calentaron a 99°C por 12 minutos. Posteriormente, se corrieron las muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 10% con Tris-Glicina 1x durante aproximadamente 24 horas, primero a 10mA hasta que el buffer de carga llegue al gel de resolución y después a 15mA hasta que el buffer de carga cayó completamente del gel.

Luego, se retiró el gel del equipo y fue lavado 3 veces con agua destilada en microondas por 30 segundos para eliminar los restos de SDS y se tiñó con azul de Coomassie.

### Análisis de clonalidad por PFGE

Se sembraron 67 aislamientos aleatoriamente en cajas de BHI y se incubaron a 37°C por 18 horas. Pasado el tiempo se prepararon suspensiones celulares con 2 ml del buffer de

suspensión celular (BSC) (anexo 12). Después se realizó una dilución 1/10 tomando 100 µl de la suspensión inicial adicionándolo en tubos de Kahn con 1.9 ml de BSC y se mezcló suavemente. Se leyó la densidad óptica (DO) a 610 nm y posteriormente se ajustó la concentración a 1 en un volumen final de 200 µl de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Suspensión\ Celular = 200 / (DO \times 10)$$

$$BSC = 200 - SC$$

En cada tubo eppendorf se adicionaron 10 µl de proteinasa K (20mg/ml) y 200 µl de agarosa Seakem Gold al 1%, calentada previamente a 50°C, y se mezcló sin formar burbujas. Inmediatamente, se dispensó en los moldes de bloques y se dejó solidificar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Para la lisis celular se preparó un buffer con 50 ml de buffer de lisis celular (BLC) y 250 µl de proteinasa K (20 µg/ml), se mezcló suavemente y se colocó 2.5 ml de la solución en tubos cónicos de 50 ml. Después se colocó cada bloque en un tubo y se dejó incubar en baño termostático con agitación (175-200 rpm) a 54°C por 2 horas. Luego se procedió a realizar lavados con agua MiliQ evitando que el bloque se cayera. Se descartó el agua y se agregó de 15 a 20 ml de Buffer TE (anexo 12) precalentado a 50°C y se volvió a colocar en el baño termostático con agitación a 50°C por 20 minutos. Este lavado se repitió 3 veces más para luego descartar el buffer del último lavado y con la espátula desinfectada colocar cada bloque en un criovial que contenga 1.8 ml de buffer TE estéril.

Para la digestión del ADN se preparó una mezcla de restricción enzimática diluyendo el buffer 10X con agua MiliQ y adicionando 3 u/µl de enzima *XbaI* por muestra de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	µl/bloque
----------	-----------

Agua MiliQ	175
Buffer D/Multicore/Buffer H	20
Enzima (10 U/ $\mu$ l)	3
Suero de Albúmina Bovina	2
Volumen final	200

Tabla 1 Mezcla de restricción enzimática

Se removió cuidadosamente el bloque del criovial y con una cuchilla se cortó 2-3 mm de ancho y se transfirió a un tubo eppendorf donde después se adicionó 200  $\mu$ l de la mezcla de restricción enzimática y se incubó en baño termostado a 37°C por 4 horas.

En ese lapso se fue preparando agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X calentando hasta disolver los cristales y manteniéndola a 55°C. Por cada peine de 15 pozos se prepararon 150 ml de agarosa al 1% en TBE 0.5X.

Una vez pasado el tiempo de incubación se detuvo la restricción dejando los eppendorf a temperatura ambiente por 5 minutos y luego retirando la mezcla de restricción enzimática y reemplazándola por buffer TBE 0.5X e incubando otros 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se colocaron los bloques sobre la parte inferior de los dientes del peine y se dejaron secar por 30 minutos a temperatura ambiente, para después colocarlo en el molde del gel y agregar la agarosa lentamente evitando burbujas. Una vez solidificado el gel se retiró el peine y se sellaron los pozos con el resto de agarosa que sobró (aproximadamente 5 ml).

El equipo de corrido (CHEF DR III) se programó de la siguiente manera:

- Tiempo de pulso inicial: 2.2 segundos
- Tiempo de pulso final: 63.8 segundos

- Voltaje: 6 V
- Ángulo: 120°
- Tiempo de corrida: 18 horas

Cuando terminó el tiempo de corrida se tiñó el gel con bromuro de etidio durante 1 hora a 30 rpm, para después proceder a desteñir en agua destilada durante 30 min a 30 rpm. La captura de la imagen se realizó con el equipo Gel Doc (Biorad) y posteriormente fueron analizados con el programa GelCompare.

## RESULTADOS

### Determinantes de resistencia a tetraciclina y sensibilidad antimicrobiana

La detección de los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* dio como resultado de manera general que 60.0% (n=90) del total de muestras estudiadas son positivos a *tet(A)*, 7.3% (n=11) a *tet(B)*, 14.0% (n=21) a *tet(G)* y 12.7% (n=19) simultáneamente a *tet(A)* y *tet(G)*. Adicionalmente, por WGS se encontraron otros genes de la familia *tet*: 1.3% (n=2) a *tet(C)*, 1.3% (n=2) a *tet(M)* y 2.0% (n=3) simultáneamente a *tet(A)* y (*M*). En los resultados por PCR convencional

1.3% (n=2) fueron negativos a los tres determinantes principales, pero podrían portar algún otro gen de la familia *tet*. Fig. 5.

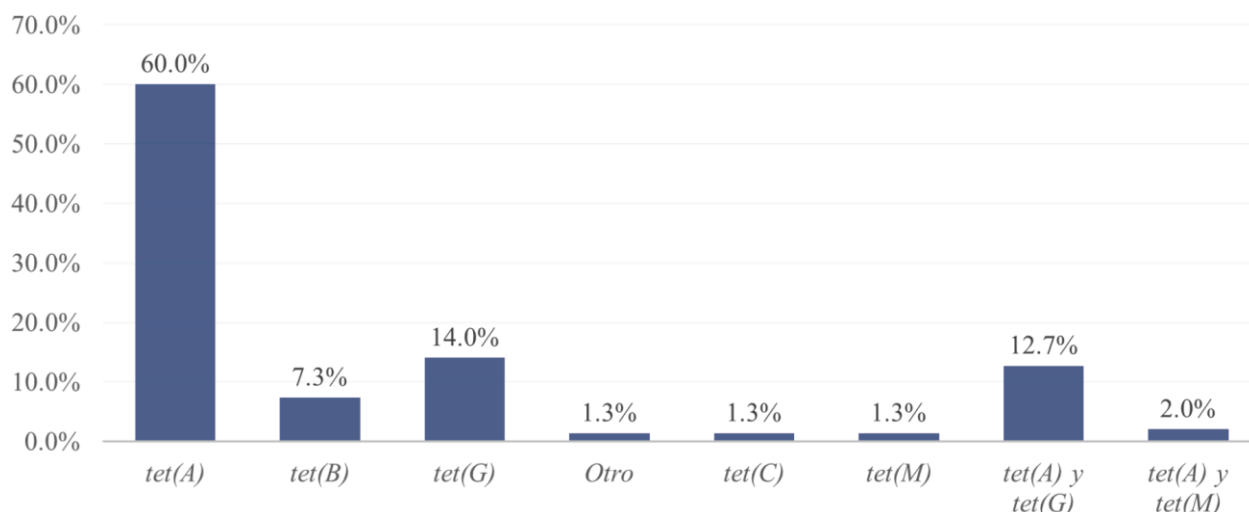


Fig. 5. Distribución de genes de resistencia a tetraciclina en aislamientos clínicos colombianos de *Salmonella Typhimurium*. Se determinó que el gen *tet(A)* es el predominante en los aislamientos clínicos colombianos analizados resistentes a tetraciclina.

Al categorizar las cepas en relación a su origen, las provenientes de materia fecal (n=47) portaron 85.1% (n=40) de *tet(A)*, 8.5% (n=4) de *tet(B)*, 2.1% de *tet(G)* (n=1) y 4.3% (n=2) de otro gen *tet*, Fig. 6; en comparación, las de hemocultivo (n=103), portaron 48.5% (n=50) de *tet(A)*, 6.8% (n=7) de *tet(B)*, 19.4% (n=19) de *tet(G)*, 1.9% (n=2) de *tet(C)*, 1.9% (n=2) de *tet(M)*, y simultaneidad de *tet(A)* y *tet(G)* que fue 18.4% (n=19) y de *tet(A)* y *tet(M)* 2.9% (n=3) Fig. 7. Estos datos indican que en ambos tipos de muestras el gen *tet(A)* es el predominante. Sin embargo, existe una menor presencia de *tet(G)* en materia fecal comparando con hemocultivo. *Tabla 2*.

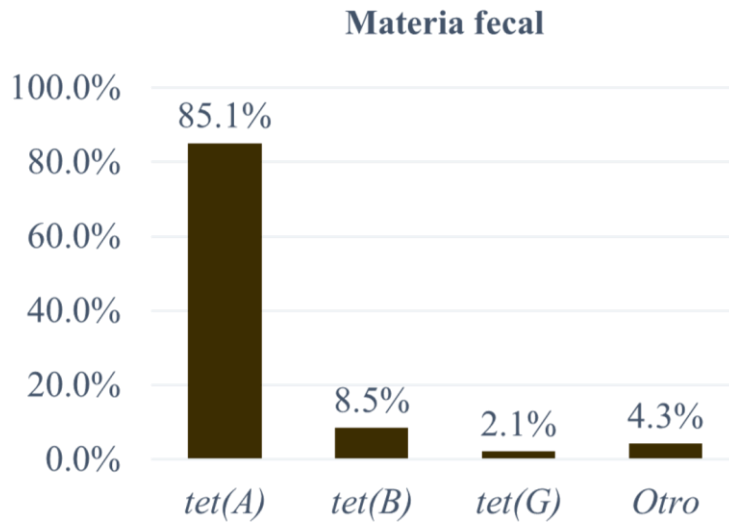


Fig. 6 Distribución de genes *tet* en muestras de materia fecal.

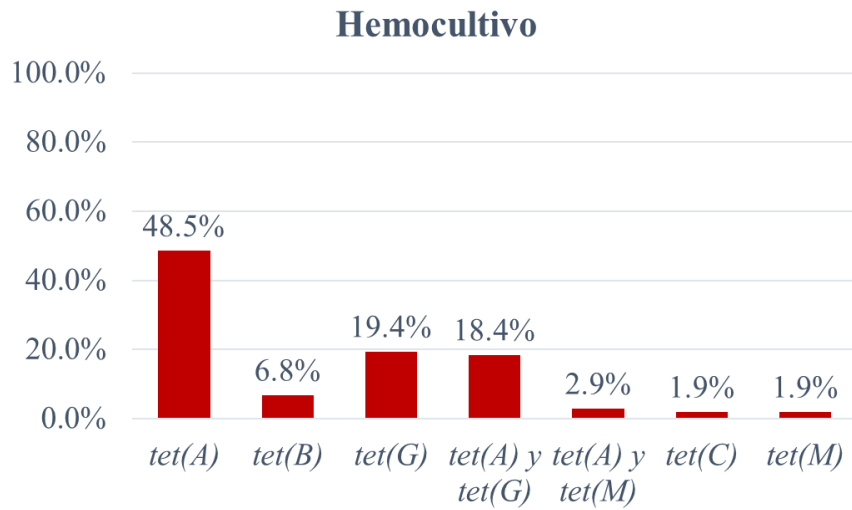


Fig. 7 Distribución de genes *tet* en muestras de hemocultivo.

			Gen determinante de resistencia a tetraciclina					Total
			<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(G)</i>	<i>tet(A)</i> y <i>(G)</i>	otro	
Procedencia	Hemocultivo	Recuento	50	7	20	19	7	103
		% del total	33.3%	4.7%	13.3%	12.7%	4.7%	68.7 %
	Materia Fecal	Recuento	40	4	1	0	2	47
		% del total	26.7%	2.7%	.7%	0.0%	1.3%	31.3 %

Total	Recuento	90	11	21	19	9	150
	% del total	60.0%	7.3%	14.0%	12.7%	6.0%	100.0 %

Tabla 2 Relación entre la procedencia de los aislamientos y los principales genes determinantes de resistencia a tetraciclina.

Para evaluar si las variables procedencia con gen determinante de resistencia son independientes se realizó una prueba de Chi cuadrado en el programa SPSS versión 21 y se obtuvo una significancia  $<0.05$ ; por lo tanto, se confirmó estadísticamente que existe un tipo de relación de dependencia entre estas variables. *Tabla 3.*

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	23.228 <sup>a</sup>	4	0.00
Razón de verosimilitud	30,873	4	0.00
N de casos válidos	150		

Tabla 3 Prueba de independencia Chi cuadrado

El ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC), nos entrega un rango de susceptibilidad a tetraciclina de entre 64, a más de 128  $\mu\text{g/ml}$ . Buscando una explicación a este elevado nivel de resistencia, se correlacionó el gen de la familia *tet* con los resultados de MIC, lo que dio como resultado que las cepas que portaban *tet(A)* o *tet(B)*, resistían en promedio más de 128  $\mu\text{g/ml}$ , en comparación *tet(G)* resistía sólo 64  $\mu\text{g/ml}$ .

gen <i>tet</i>	Número de aislamientos (n)	MIC tetraciclina $\mu\text{g/ml}$
<i>tet(A)</i>	6	+ 128
<i>tet(B)</i>	3	+ 128

<i>tet(G)</i>	1	64
---------------	---	----

Tabla 4 Determinación del nivel de susceptibilidad a tetraciclina de aislamientos representativos

### Análisis de grupos de incompatibilidad plasmídico

Al realizar la extracción plasmídica por lisis alcalina y posteriormente visualizarlo a través de electroforesis en geles de agarosa, se confirmó la presencia de plásmidos de diversos tamaños en los aislamientos clínicos colombianos, y tomando como referencia la cepa mexicana YU39 (102) se identificó aproximadamente el peso molecular de las bandas mayores o iguales a 40 kb. Fig. 8. Sin embargo, por este método no se pudo identificar el grupo de incompatibilidad de las bandas obtenidas.

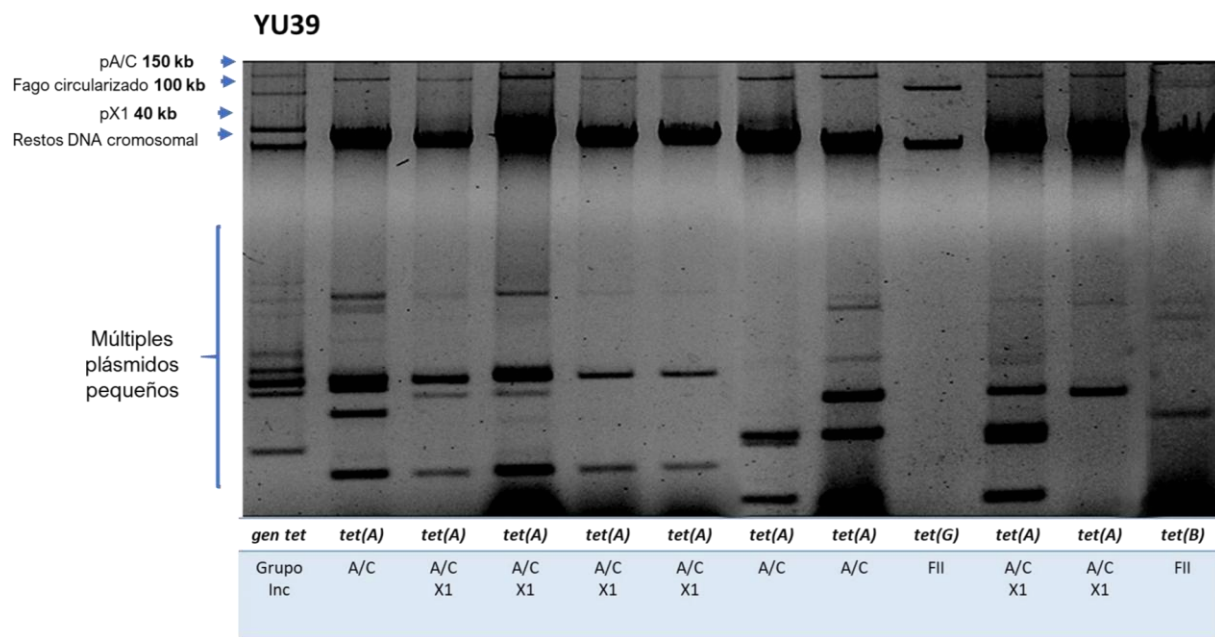


Fig. 8 Visualización de la diversidad de plásmidos en aislamientos clínicos colombianos



Posteriormente, con el uso de PCR convencional y el análisis de las secuencias de WGS se determinaron los grupos de incompatibilidad plasmídicos y se analizaron de acuerdo con la procedencia clínica de los aislamientos. En las cepas provenientes de materia fecal se obtuvo como resultado tanto de manera individual como en conjunto con otros grupos de incompatibilidad una predominancia de IncA/C en un 56% (n=29), seguido de IncX1 en un 35% (n=18) y finalmente IncFII en un 10% (n=5). En el caso de las muestras de hemocultivo que fueron analizadas por WGS, la búsqueda por medio de la plataforma PlasmidFinder 2.0 dio como resultado mayor predominio de IncFII en un 46% (n=58), seguido de IncX1, IncQ1 e IncA/C en un 26% (n=33), 17% (n=21) y 9% (n=11) respectivamente. Fig. 9.

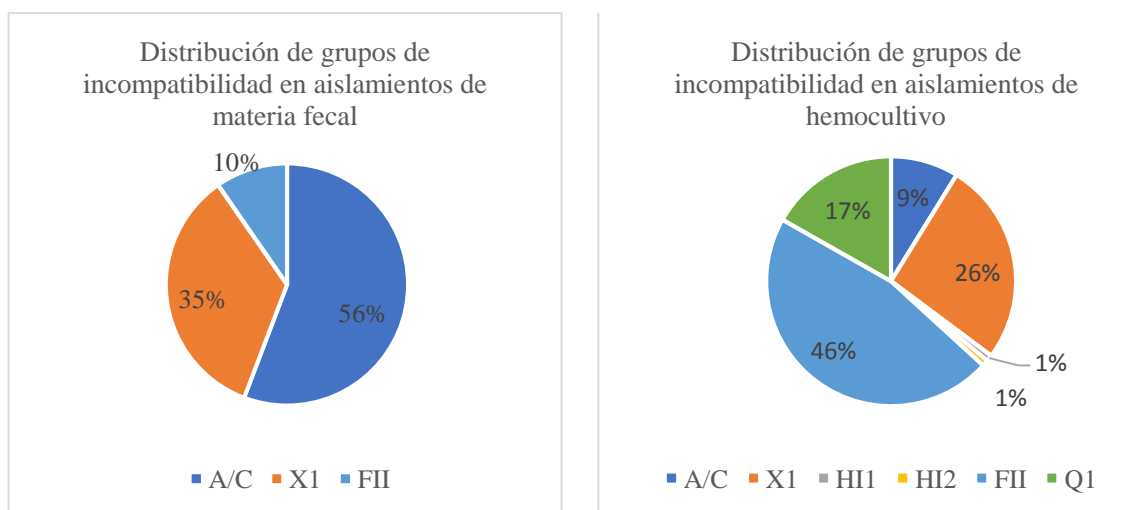


Fig. 9 Distribución de los grupos de incompatibilidad en relación a la procedencia de la muestra

Después, se determinó presencia simultánea de los grupos de incompatibilidad con los genes de la familia *tet*. En las muestras de materia fecal, se evidenció una fuerte simultaneidad entre los grupos IncA/C e IncX1 con el gen *tet(A)*, siendo 97% (n=28) y 94% (n=17) respectivamente. En comparación, IncFII estuvo distribuido de manera más homogénea en *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* con un 40% (n=2) para los dos primeros y 20% (n=1) para el último.

En el caso de los aislamientos de hemocultivo, se mantuvo la alta simultaneidad entre el gen *tet(A)* y los grupos IncA/C e IncX1 en un 91% (n=10) y 100% (n=33). Además, también se

detectaron IncQ1 (n=21) e IncHI2 (n=1) en un 100% de simultaneidad con este gen. También se encontró una muestra de IncHI1 coincidente con *tet(B)*. De manera similar a los aislamientos de materia fecal, IncFII estuvo presente en cepas que portaban *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* en un 57% (n=33), 9% (n=5) y 34% (n=20). Adicionalmente, se encontraron cepas que no poseían plásmidos, pero portaban 33% (n=1) *tet(A)* y 67% (n=2) *tet(B)*. Fig. 10.

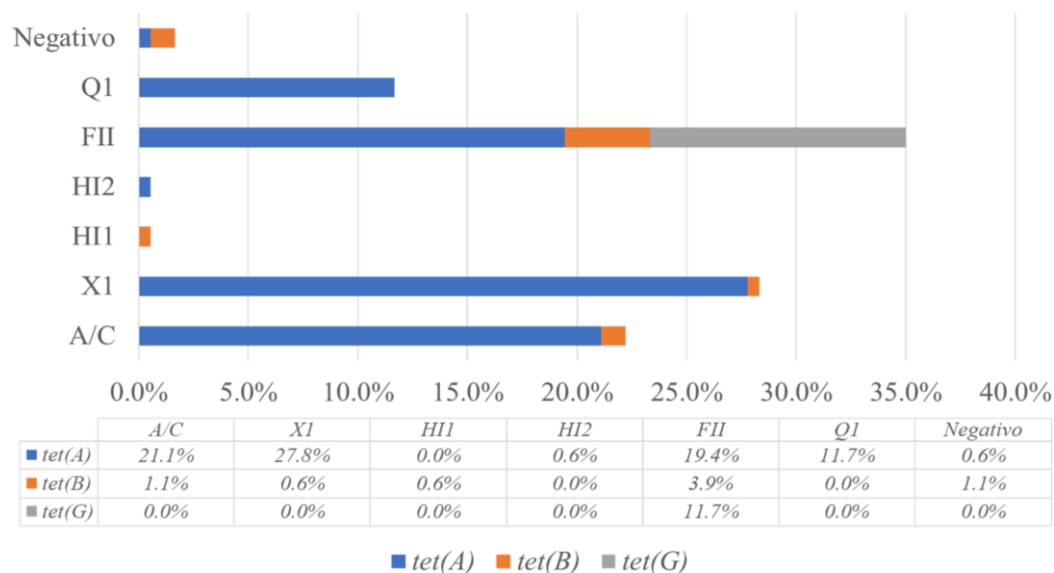


Fig. 10 Presencia simultánea de genes de resistencia *tet* con grupos de incompatibilidad plasmídicos

### Análisis del entorno genómico por secuencia de genoma completo (WGS)

De los aislamientos analizados por secuencia de genoma completo (WGS), las 100 cepas provenientes de hemocultivo fueron anotadas en la plataforma web PATRIC 3.5.31.

Posteriormente, a través de la herramienta ‘Features’ se encontraron los siguientes determinantes de resistencia a tetraciclina: *tet(A)* (n=48), *tet(B)* (n=5), *tet(C)* (n=2), *tet(G)* (n=19) y *tet(M)* (n=2), y sus combinaciones *tet(A)* y *tet(B)* (n=1), *tet(A)* y *tet(G)* (n=20) y *tet(A)* y *tet(M)* (n=3).

## Análisis de las secuencias positivas a *tet(A)*

En los 70 aislamientos positivos a *tet(A)*, tanto de manera individual como en combinaciones, se identificó el gen en contigs de tamaños muy variados desde 3 778 pb hasta 24 434 pb. De acuerdo con la similitud de las secuencias, estas se asociaron en 10 grupos. El primer grupo fue el predominante e incluyó 27 aislamientos con contigs de 2 443 pb a 7 425 pb. El alineamiento BLAST encontró secuencias de enterobacterias como *Klebsiella* spp (Genbank: MH909349.1), *Salmonella* spp (Genbank: CP037959.1) y *Citrobacter* spp (Genbank: LR536427.1), pero ninguna tuvo más del 61% de cobertura. En este grupo se logró detectar los genes *tet(R)*, *tet(A)*, *pecM* y una transposasa Tn3 correspondientes a un transposón parcial Tn1721 (Tn1721 $\Delta$ ) y una región de 2 873 pb sin identificar. El segundo grupo incluyó 26 cepas con contigs entre 3 776 pb y 10 955 pb. El alineamiento BLAST mostró una única coincidencia con cobertura del 100% y 99.79% de identidad de manera lineal correspondiente a un plásmido de *Salmonella enterica* serovar Manhattan cepa SA20084699 (Genbank: CP022498.1). Los genes encontrados fueron *tet(R)*, *tet(A)*, seguido de una secuencia tipo plásmido RSF1010 que portaba los genes *mobC*, *mobA/repB*, *repA*, *orfE*, *cac*, *repC*, *folp*, *strA* y *strB*. Asimismo, 9 secuencias de este grupo tuvieron una mayor distancia, de 276 pb, entre los genes *tet(A)* y *mobC*. El tercer grupo incluyó 11 aislamientos con contigs entre 3 054 pb a 24 455 pb. El alineamiento con BLAST dio una única secuencia con cobertura del 100% e identidad 99.9% en dos fragmentos correspondiente al plásmido pUO-STmRV1 de *Salmonella enterica* (Genbank: CP018220.1). El alineamiento dio como resultado un

Tn1721 $\Delta$  que portaban el determinante de resistencia a tetraciclina, seguido del gen *rhs* que codifica una proteína involucrada en el sistema de secreción tipo IV y muchos genes hipotéticos. En el cuarto grupo se agruparon dos cepas con contigs de 7 763 pb y 8 243 pb. Después de realizar el alineamiento BLAST se identificó una secuencia plasmídica de *Shigella* spp (Genbank: CP034068.1) con 100% de cobertura y 99.99% de identidad; seguido de secuencias con al menos dos fragmentos de coincidencias. Además de la resistencia a tetraciclina, se identificó un segmento parcial tipo plásmido RSF1010 que albergaba los genes *folp*, *strA* y *strB*. El quinto grupo albergó una sola muestra con un contig de 8 133 pb. El resultado del alineamiento BLAST fueron 4 secuencias de *Salmonella* a nivel plasmídico que

dieron cobertura e identidad del 100%. (Genbank: CP028316.1, CP031362.1, CP022063.2 y CP006050.1). Se logró identificar parcialmente el gen *tet(A)* inserto en un

Tn1721 $\Delta$  y un operón de resistencia a mercurio. El sexto grupo incluyó un solo aislamiento con un contig de 3 962 pb que dio como resultado de BLAST una secuencia del plásmido pMCR8\_020135 de *Klebsiella pneumoniae* (Genbank: CP037964.1) con 100% de cobertura e identidad fragmentada en 2 segmentos. Se identificó en la secuencia un Tn1721 $\Delta$  y un Tn2 $\Delta$ , este último albergaba un gen *blaTEM-1b* y parcialmente una resolvasa Tn3. El séptimo grupo portó solo un aislamiento con un contig de 8 448 pb. El alineamiento BLAST identificó una secuencia del plásmido pF2\_14D\_HI2 de *Escherichia coli* (Genbank: MK461931.1) con un 64% de cobertura y 100% de identidad fragmentada en 2 segmentos. Se reconoció una variante de Tn1721 $\Delta$  que portaba una región no identificada de 3 194 pb entre los genes *tet(A)* y *pecM*. Finalmente, el octavo grupo solo incluyó un aislamiento con un contig pequeño de 3 778 pb. El alineamiento BLAST dio un 100% de cobertura e identidad con una secuencia plasmídica de *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium (Genbank: CP021463.1). Estos resultados se resumen en la Fig. 11.

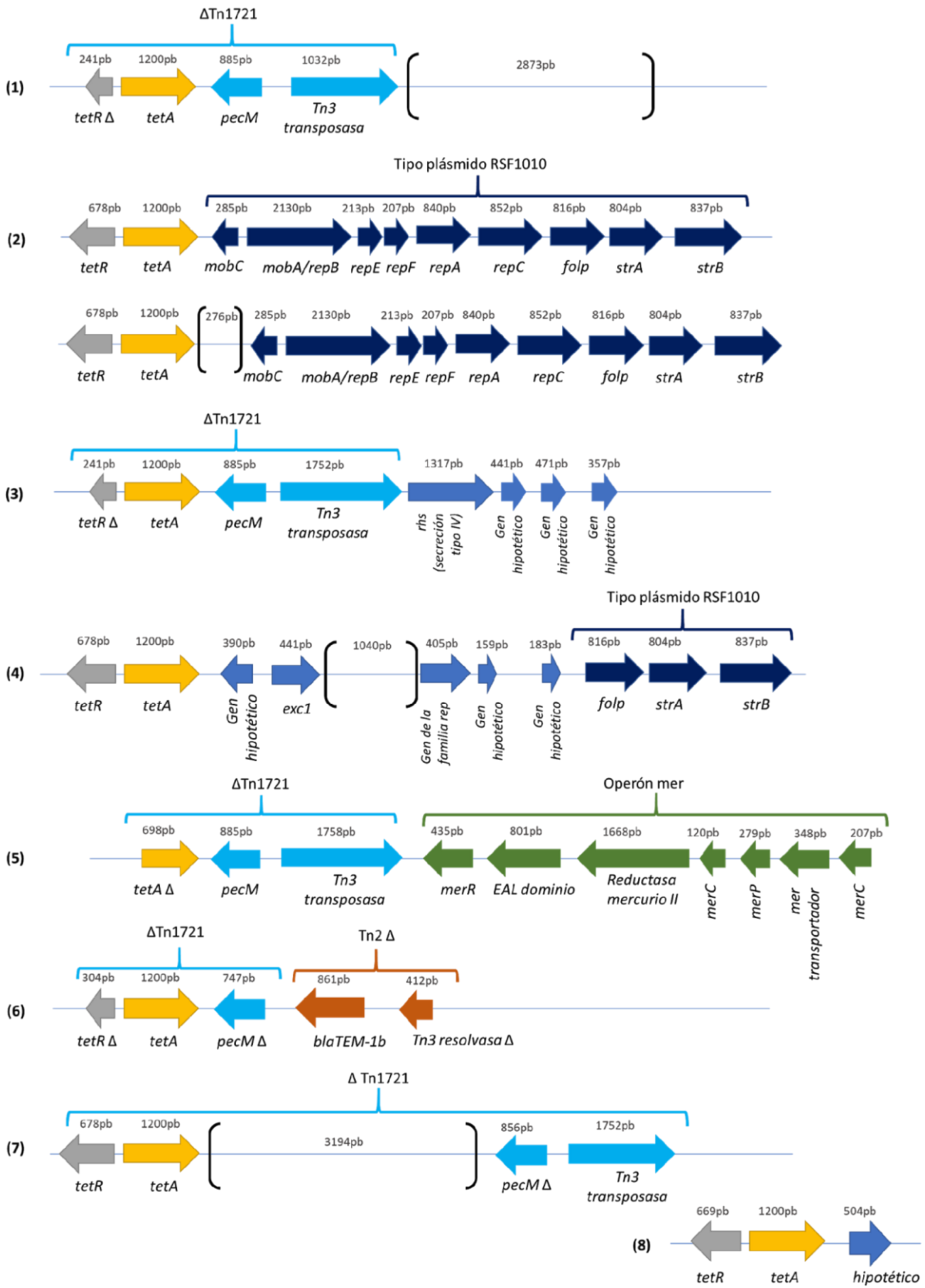


Fig. 11 Entornos genéticos vinculados al gen *tet(A)*. Los espacios en corchetes son regiones no codificantes.

Con el objetivo de identificar mutaciones en los genes *tet(A)* de los aislamientos, se compararon con el gen *tet(A)* del Tn1721 (Genbank: X61367.1). Se logró identificar que el 57.1% (n=40) de las cepas portaban un gen idéntico al de este transposón y el restante 42.9% (n=30) presentaban cambios nucleotídicos. De estos últimos pudieron clasificarse cuatro grupos: el primero tuvo una presencia general de 27.1% (n=19) y correspondió a la región de los últimos 22 pb del gen *tet(A)* con 17 variaciones nucleotídicas.; el segundo estuvo en un 12.9% (n=9) y presentó un solo cambio nucleotídico de una adenina por guanina en la posición 124; el tercer grupo tuvo una presencia de 1.4% (n=1) y un cambio de guanina por adenina en la posición 277; el cuarto grupo también tuvo una presencia de 1.4% (n=1) y tuvo 61 cambios nucleotídicos siendo el gen que tenía menor similitud con la referencia (94.9%).

Para conocer si las diferencias nucleotídicas conllevan a un cambio aminoacídico se tomó como referencia de TetA(A) la secuencia Uniprot P02982 de 399 aminoácidos y se procedió a comparar con las cepas estudiadas. Se evidenciaron cuatro grupos de secuencias, que fueron los mismos grupos de cambios aminoacídicos, de las cuales la más predominante fue idéntica a la referencia. El segundo grupo se caracterizó por poseer una mutación que condujo a un cambio aminoacídico T42A en la locación del bucle P1. En el tercer grupo se encontraron dos cambios aminoacídicos M1V en C1 y A93T en TM3. Finalmente, el cuarto grupo fue el que presentó mayor cantidad de cambios aminoacídicos (n=22), de los cuales la mayoría se encontró en regiones transmembranales (n=16). Fig. 12.

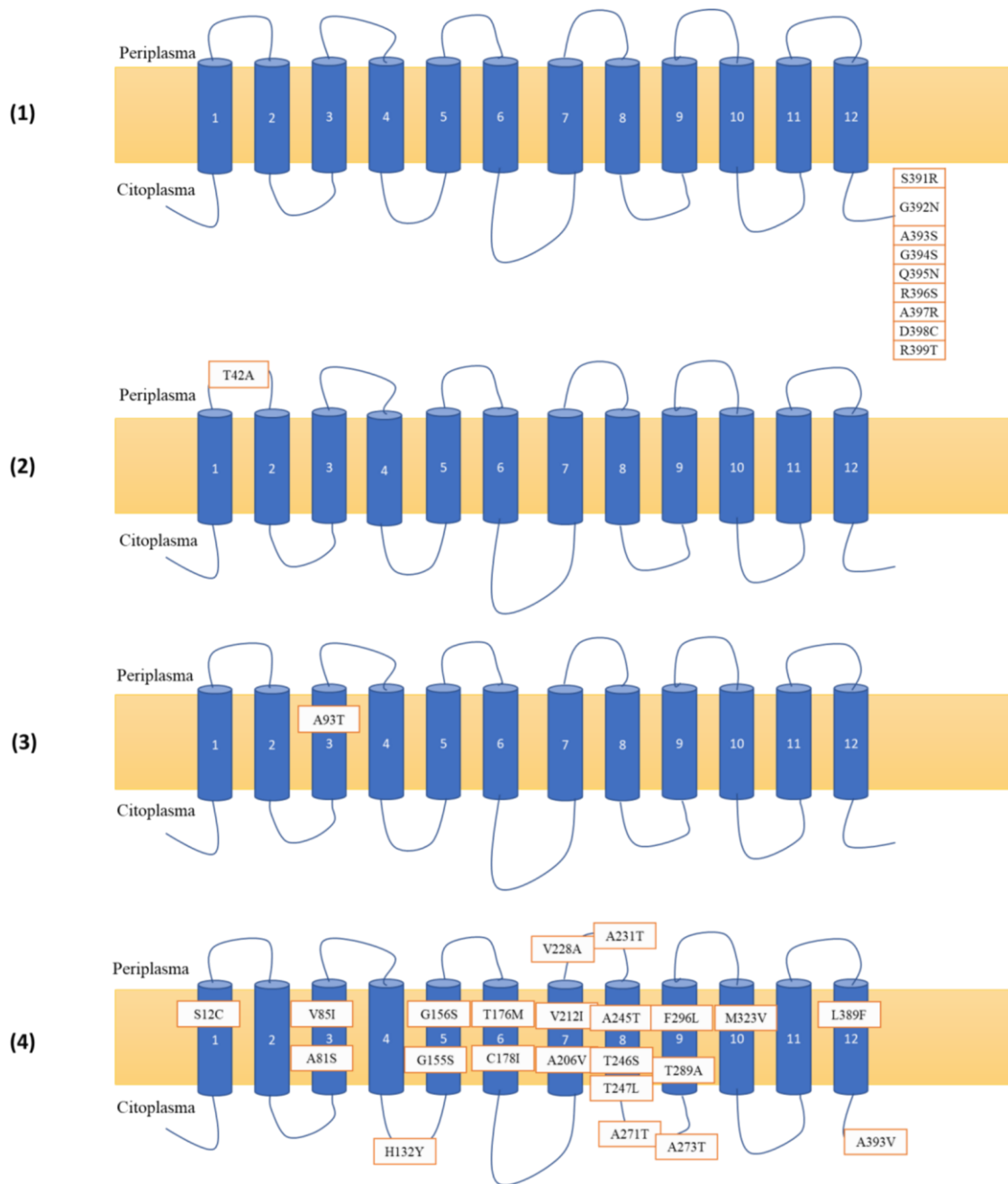


Fig. 12 Cambios aminoacídicos encontrados en el gen *tet(A)*

Análisis de las secuencias positivas a *tet(B)*

En los 6 aislamientos positivos a *tet(B)* se identificó el gen en contigs de tamaños muy variados desde 5 332 pb hasta 21 776 pb. De acuerdo con la similitud de las secuencias, estas se asociaron en 4 grupos. El primer grupo incluyó 2 aislamientos con contigs de 13 673 pb y 13 612 pb. El alineamiento BLAST mostró una única coincidencia con cobertura del 100% y 99.99% de identidad de manera lineal correspondiente al plásmido pF8475 de la *Salmonella enterica* cepa F8475 (Genbank: KP899804.1). El alineamiento logró identificar principalmente los siguientes genes: *tet(B)*, *tet(R)*, *jemC* o *arsR*, *jemB* o *ydjB*, *jemA* o *ydjA*, *gltS* y una transposasa IS10L. Estos genes corresponden a un transposón parcial tipo 10 ( $\Delta$ Tn10). El segundo grupo incluyó dos cepas con contigs de 21 776 pb y 14 541 pb. De manera similar al grupo anterior se realizó un alineamiento en BLAST y el resultado fue de cobertura e identidad al 100% con la cepa DA34837 de *Salmonella enterica* a nivel cromosomal (Genbank: CP029568.1). El alineamiento identificó que el gen *tet(B)* estaba inserto en un  $\Delta$ Tn10 y de manera adyacente se encontró un operón de resistencia a mercurio. El tercer grupo albergó sólo una cepa con un contig de 5 332 pb, su alineamiento por BLAST encontró 2 secuencias plasmídicas de *Escherichia coli* (Genbank: CP029690.1 y CP014090.2) con cobertura e identidad al 100% pero segmentada en 2 regiones. La integración de estas regiones resultó en un  $\Delta$ Tn10 seguido por una transposasa truncada de la familia IS4 y de una transposasa de la familia IS3. El cuarto y último grupo tuvo un alineamiento BLAST al 100% en cobertura e identidad con un aislamiento del plásmido p16Pre36-NDM de *Providencia rettgeri* (Genbank: KX832927.1). Esta secuencia se caracterizó por tener un  $\Delta$ Tn10 seguido de una transposasa tipo IS5 en su extremo izquierdo.

Estos resultados se resumen en la Fig. 13.



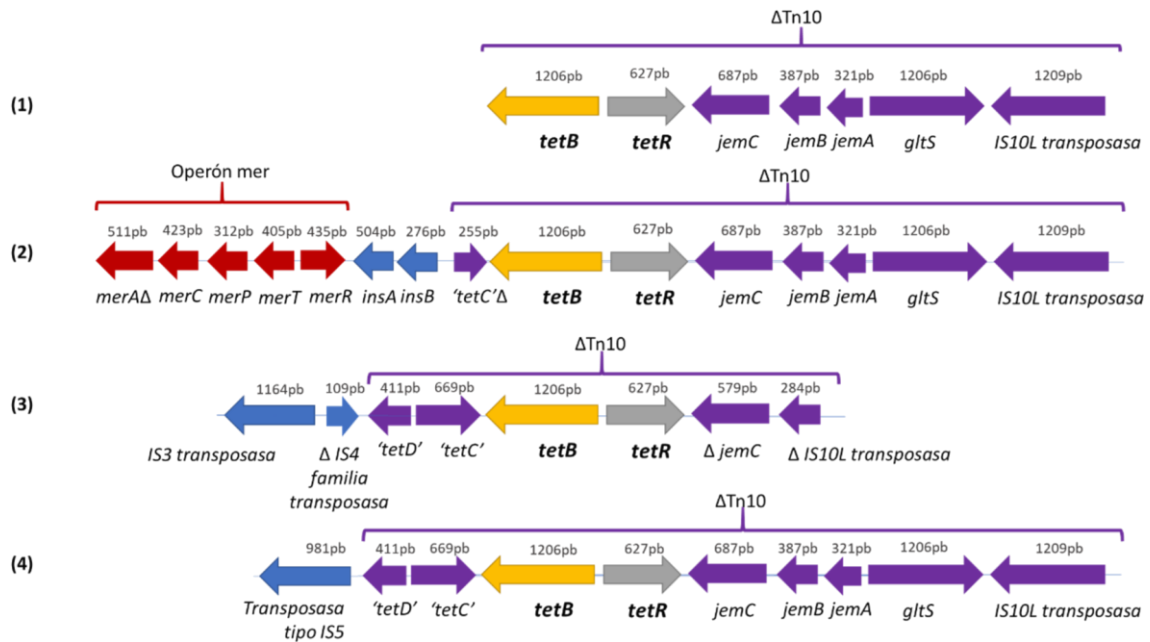


Fig. 13 Entornos genómicos de los aislamientos positivos al gen *tet(B)*.

### Análisis de las secuencias positivas a *tet(G)*

De los 39 aislamientos positivos a *tet(G)*, tanto de manera individual como en combinaciones, 37 cepas portaban el gen en contigs pequeños (en promedio 4 631 pb), las 2 cepas restantes tenían contigs con promedio de 64 121 pb. Cuando se realizó el alineamiento de todos los contigs por el programa Geneious se obtuvo un 100% de identidad en una secuencia consenso de 5 807 pb, la cual fue sometida a BLAST en la página del NCBI. El primer alineamiento muestra una secuencia cromosomal completa de *Salmonella enterica* cepa DA34833 (Genbank: CP029595.1) con una cobertura e identidad del 100%. Las demás secuencias alineadas son mayoritariamente *Salmonella enterica* con una cobertura del 100% e identidad del 99.98%. Se descargó la secuencia de la cepa DA34833 (Genbank: CP029595.1) y en el programa Geneious se alineó con la secuencia consenso de *tet(G)* (5 807 pb). El alineamiento identificó los siguientes genes: *qacE $\Delta$ 1*, *sul1A/folP*, *floR*, *tet(R)*, *tet(G)* y un *orf1/lysR*. Las dos cepas positivas a *tet(G)* que tenían contigs en promedio de 64 121 pb se analizaron individualmente para evaluar el entorno genómico del gen *tet(G)*. El contig de la primera cepa posee 62 530 pb y su alineamiento en BLAST dio secuencias con una cobertura e identidad

del 100%, entre las cuales figura la cepa DA34833 (Genbank: CP029595.1). El alineamiento identificó al gen *thdf*, así como también a un integrón clase 1 portando el gen *aadA2*. Sin embargo, la falta de un segundo integrón y del gen *yidY* en el contig evita confirmar que se trate de la SGI1 completa, pero sugiere que se trate de una variante. La segunda cepa presentó un contig grande de 65 712 pb y su alineamiento en BLAST no dio secuencias con cobertura completa de manera lineal. La cepa DA34833 (Genbank: CP029595.1) mostró cobertura e identidad del 100% dividida en 3 segmentos. Se descargaron las secuencias de los 3 segmentos y se alinearon con el contig dando como resultado los siguientes genes: *thdf*, así como también a un integrón clase 1 portando el gen *pse1*. De manera similar al contig anterior no se puede confirmar que sea la SGI1 completa, pero sugiere que es una variante de la misma. Fig. 14.

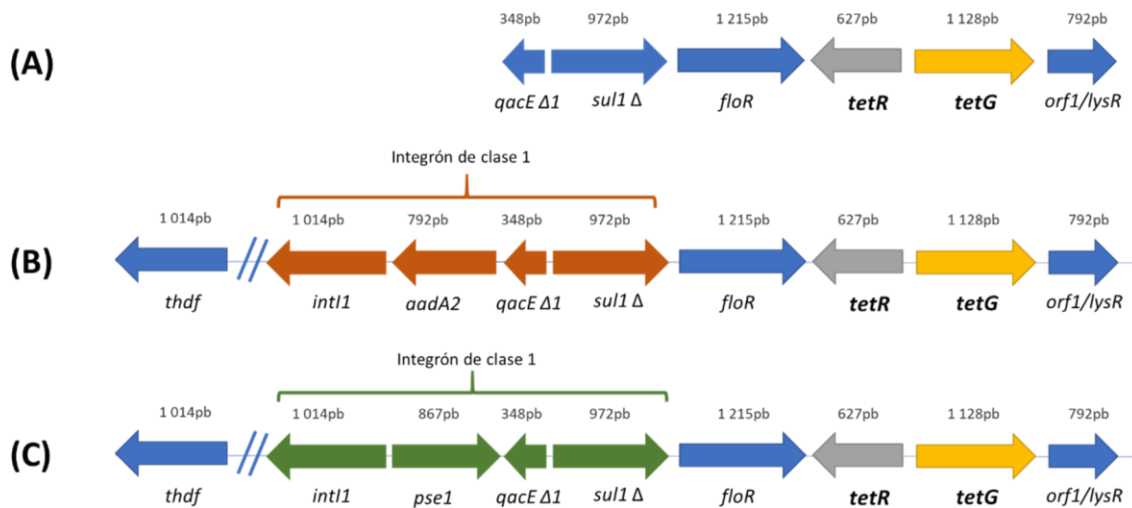


Fig. 14 Entorno genómico del gen *tet(G)*. (A) Organización genética compartida por todos los aislamientos positivos a *tet(G)*. (B) y (C) Representación de los dos contig de gran tamaño.

## Análisis de las OMPs

Para evaluar la resistencia intrínseca de la bacteria a tetraciclina, se evaluó visualmente la expresión de las OMPs. La expresión de proteínas en medio LB sin antibiótico fue muy similar en todos los aislamientos, incluida la cepa control, y se lograron visualizar tres bandas muy claramente las cuales se interpretaron como OmpC/F, OmpD y OmpA según Lee *et al* 1980 (72). Cuando se hizo la comparación de los aislamientos con y sin tetraciclina se encontraron los siguientes 4 perfiles de cambios en la expresión de proteínas:

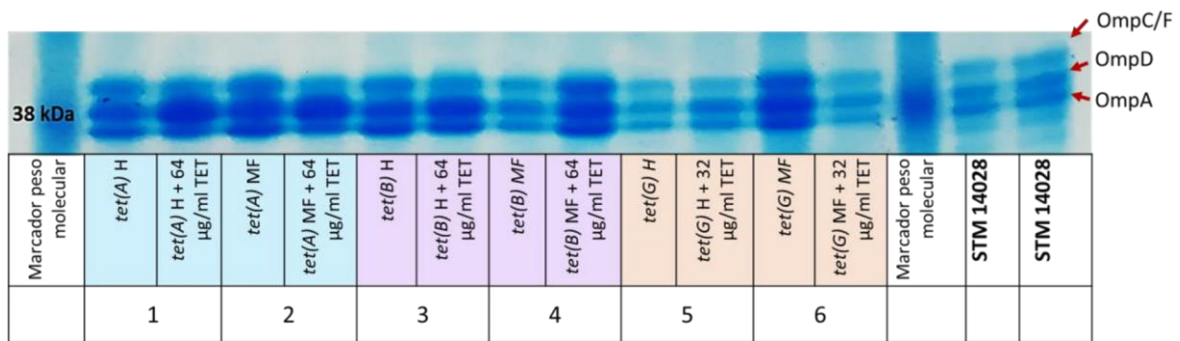


Fig. 15. Variación de los perfiles de expresión de proteínas de membrana externa después de la exposición a tetraciclina.

### Análisis de la clonalidad por PFGE

El dendograma generado por UPGMA utilizando la prueba de electroforesis en campo pulsado (PFGE) con la enzima XbaI, resultó en dos clados principales: El primer clado fue el más diverso y agrupó aislamientos que portaban genes *tet(A)*, *tet(B)* o *tet(G)* sin distinción; con excepción de 3 aislamientos *tet(B)* que se agruparon en un solo subclado. Fig. 16.

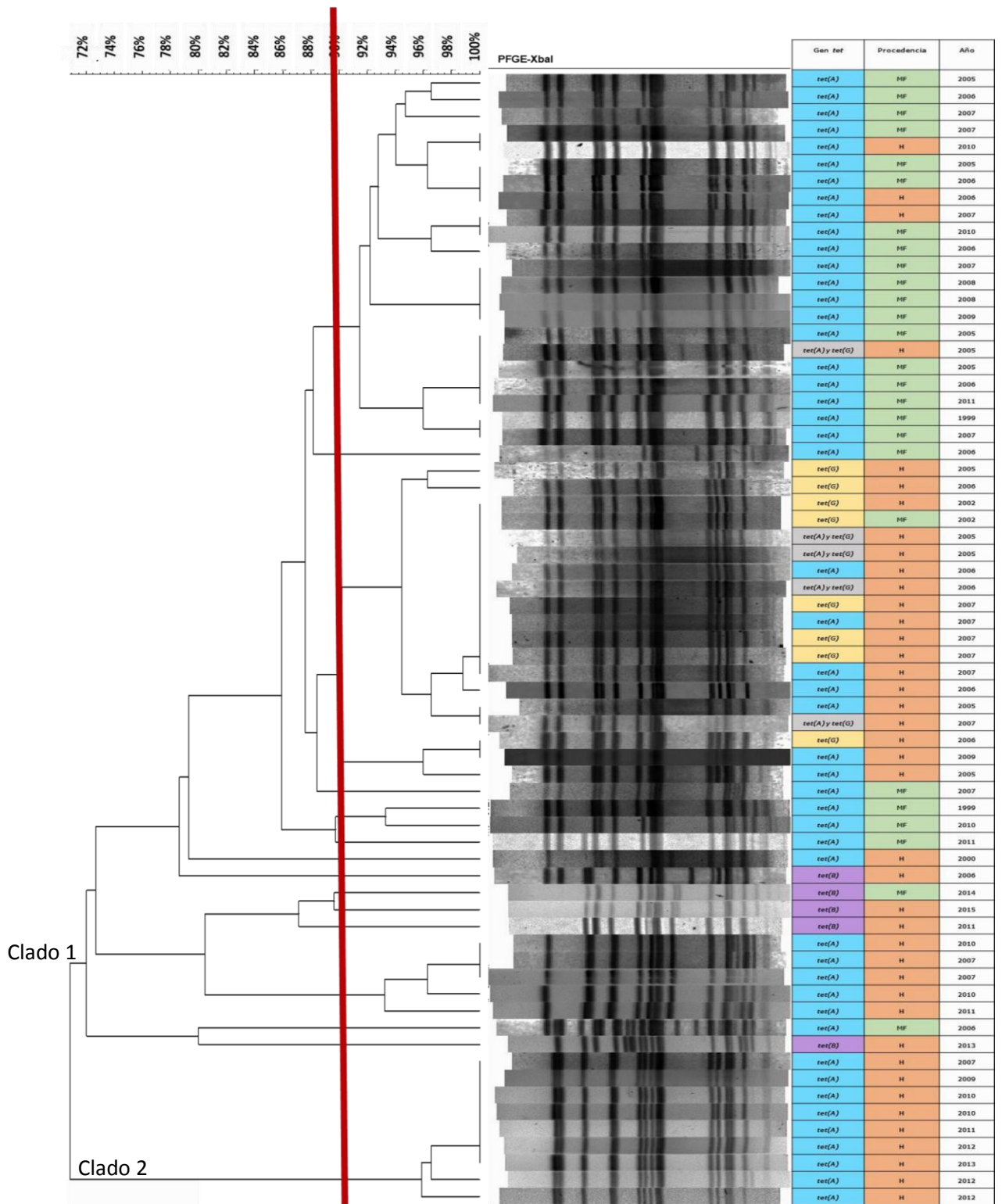


Fig. 16. Dendrograma de PFGE - XbaI y su relación con los genes *tet*

## DISCUSIÓN

Los determinantes de resistencia a tetraciclina más abundantes en enterobacterias corresponden a aquellos que codifican bombas de eflujo (94), y entre ellos los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* son los más predominantes en el género *Salmonella* spp. y se caracterizan por otorgar una resistencia diferencial en relación al tipo de tetraciclina al cual se le está enfrentando (95,96,132). En los resultados obtenidos *tet(A)* fue el gen más predominante, seguido de *tet(G)* y *tet(B)*; sus valores de MIC fueron muy similares a los reportados anteriormente para tetraciclina. En el caso, de los aislamientos que portaron 2 genes *tet*, no se realizó esta prueba porque ya se ha reportado que una bacteria que porta más de un gen *tet* no aumenta su MIC; sino que es posible que las fuertes presiones de selección proporcionadas por ambientes que contienen niveles elevados de tetraciclina conduzcan a la adquisición de más de un gen de resistencia en una bacteria debido a su prevalencia en el medio ambiente, en lugar de una ventaja selectiva (153).

Se conoce que la multirresistencia diseminada a través de plásmidos ha sido ampliamente reportada en enterobacterias (98–100,154–156). Además, los plásmidos también han sido caracterizados por portar genes de virulencia y en *Salmonella* Typhimurium el plásmido de virulencia característico de este serovar pertenece al grupo de incompatibilidad IncFII (105,106,157). Los resultados obtenidos indican mayor presencia de este grupo de incompatibilidad en aislamientos obtenidos de hemocultivo, los que podrían estar asociados a una mayor virulencia. En el caso de los aislamientos obtenidos de materia fecal una mayor presencia del grupo de incompatibilidad IncA/C podría estar relacionado a un linaje de hospederos animales según lo anteriormente reportado (158).

Con respecto a los análisis de secuencias nucleotídicas de *tet(A)*, se identificó predominancia de un Tn1721 según ya ha sido reportado anteriormente (104). En relación con el entorno genómico, el primer grupo fue el mayoritario; sin embargo, no tuvo alineamiento al 100% con ninguna secuencia publicada en el Genbank y fue característico un fragmento no

codificante de 2 873 pb. Considerando que muchas de las secuencias obtenidas por WGS y analizadas en esta investigación no fueron alineadas con 100% de cobertura lineal cuando se les comparó con secuencias publicadas, podría indicar que en Colombia los genes de resistencia a tetraciclina se encuentran en entornos genómicos que han pasado por eventos evolutivos diferenciados del resto del mundo. Estos entornos pudieron ser modificados por episodios de cortes, integraciones y/o recombinaciones de transposones, fagos u otros elementos genéticos móviles; como respuesta a una presiones selectivas cambiantes (159–161). Esta presión puede ser causada por tetraciclina en conjunto con el uso de otros fármacos creando una co-selección de múltiples genes de resistencia (127).

Siguiendo con el análisis de las cepas positivas a *tet(A)*, algunos de los plásmidos más estudiados en esta clasificación son: RSF1010, R300B y R1162, que son casi idénticos y fueron aislados de *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (162). Estos plásmidos pertenecen al grupo de incompatibilidad tipo Q (IncQ) y se caracterizan por poseer un origen de replicación (*oriV*) y tres proteínas codificadas por el mismo plásmido (RepA, helicasa; RepB, primasa y RepC, iniciador) para la replicación (163–165). Adicionalmente, este tipo de plásmido posee una región de resistencia a estreptomicina (*strA* y *strB*) y sulfonamida (*folP*) (156). Existe un reporte donde esta estructura se ha encontrado inserta a nivel cromosomal en *Salmonella* Typhimurium (166), y otro estudio donde se relaciona con el gen de resistencia *tet(A)*(167). En las cepas colombianas estudiadas y categorizadas dentro del grupo 2 de *tet(A)* positivas, que son los segundos más abundantes, se ha encontrado una organización genética idéntica a la del plásmido RSF1010, y curiosamente el 80.7% (n=21) de estos aislamientos portaba el grupo de incompatibilidad IncQ. Adicionalmente el grupo 4 de *tet(A)* también presentó la región de multiresistencia de este tipo de plásmido, lo que indicaría su amplia distribución. El uso a largo plazo de la tetraciclina selecciona no solo las bacterias resistentes a la tetraciclina sino también las cepas resistentes múltiples porque los genes tet están presentes en los mismos elementos móviles que otros genes de resistencia, fenómeno conocido como la paradoja de los antibióticos (168), lo que explicaría la movilización de regiones multiresistentes.

En este estudio se evidenció que todos los aislamientos positivos a *tet(B)* tienen el gen inserto en un  $\Delta$ Tn10, hallazgo que ha sido previamente reportado en la literatura (111,112,135). En relación a este gen, se ha publicado que la región de multirresistencia de plásmidos IncHI1 porta un  $\Delta$ Tn10 (135). En un estudio reciente realizado en muestras de *Salmonella* Typhimurium monofásica se halló la misma región multirresistente derivada de IncHI1 reemplazando a nivel cromosomal al operón *fljAB* (169). Al comparar mediante alineamiento la secuencia referenciada en este último artículo mencionado (Genbank: KR856283) con las secuencias estudiadas que reportaron un  $\Delta$ Tn10, se encontró 100% de similitud en el segundo grupo de cepas que portaban *tet(B)* junto con un operón de resistencia a mercurio, lo que indicaría que los aislamientos clínicos pasan por una presión selectiva a metales probablemente causado por una fase ambiental, tal como se ha reportado anteriormente (109,170,171). Adicionalmente, la búsqueda a través de PlasmidFinder dio resultado negativo a plásmidos reportados anteriormente en enterobacterias. Si bien estos datos no confirman directamente que la resistencia sea plasmídica o cromosomal, infiere que, en los aislamientos colombianos, esta región multirresistente podría transmitirse de manera horizontal y vertical.

Siguiendo con el análisis en el gen *tet(B)*, entre las investigaciones clínicas recientemente reportadas sobre enterobacterias colombianas, una en particular realizó secuenciación de plásmidos de los géneros *Providencia rettgeri*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* y sus resultados confirman el primer reporte de un plásmido denominado p16Pre36-NDM, el cual porta los siguientes genes de resistencia *aadA1*, *aph(30)-Ia*, *bla<sub>NDM1</sub>*, *sul2*, *sul1*, *tet(B)*, *dfrA1*(155). De manera particular en el alineamiento realizado en esta investigación, el cuarto grupo positivo a *tet(B)* tuvo 100% en cobertura e identidad con el plásmido p16Pre36-NDM de *Providencia rettgeri* (Genbank: KX832927.1). Estos hallazgos sugieren la diseminación de plásmidos que llevan genes de resistencia a antibióticos entre diferentes géneros de enterobacterias.

Hace unas décadas se reportó un aumento de *S. enterica* serovar Typhimurium fagotipo DT104 (64,172). Esta variante caracterizada por tener un perfil multirresistente asociado a una región de 13 kb de la SGI-1 (62) no ha sido reportada oficialmente en Colombia. Sin embargo, los resultados

obtenidos en este estudio a través del secuenciamiento sugieren que la presencia de *tet(G)* podría estar vinculada a esta isla genómica.

En resumen, el entorno genómico de los aislamientos analizados por WGS se caracterizó por ser distinto en cada determinante de resistencia a tetraciclina. El 58.57% de los positivos a *tet(A)* tenían el gen inserto en un Tn1721, elemento característico por su modo replicativo de transposición que contribuye a la proliferación y al éxito evolutivo (59,173). Todos los genes *tet(B)* estuvieron insertos en un Tn10, el cual es un elemento con un mecanismo de transposición conservativo (58). Y todos los genes *tet(G)* se encuentran en una estructura tipo SGI1 la cual se ha reportado a nivel cromosomal (62).

Con respecto a las diferencias aminoacídicas encontradas en los genes *tet(A)*, anteriormente se ha reportado que el cambio de aminoácidos en la región interdominio del gen *tet(A)* puede ser el mayor causante de reducir la susceptibilidad de la bacteria frente a minociclina y tigeciclina (119). En este estudio se encontraron los mismos cambios de aminoácidos localizados en los codones 201, 202 y 203; correspondiente al reemplazo de serina, fenilalanina y valina por alanina, serina y fenilalanina. Además, también se hallaron otras mutaciones en el gen, tales como el reemplazo de alanina y treonina por treonina y serina en los codones 231 y 246 respectivamente. Estas mutaciones ya han sido reportadas anteriormente como presuntos cambios que confieren resistencia a gliciliclinas (120); e inclusive, se ha propuesto que el cambio de un radical hidrofóbico como el triptófano por un hidrofílico como la alanina puede favorecer el reconocimiento de las gliciliclinas (119). Sin embargo, aún no se han confirmado estas teorías.

Se ha reportado que la variación en la expresión de proteínas es un mecanismo intrínseco de resistencia antimicrobiana (67). En este estudio, las tres bandas de proteínas que se visualizaron son similares a las reportadas anteriormente por Lee *et al.* (1980) (72) en *Salmonella Typhimurium* LT2, y extrapolando su representación esquemática de migración a las muestras aquí analizadas, se observó que las expuestas a tetraciclina presentaron una primera banda que no podía diferenciar OmpC y OmpF, además esta banda disminuía su



expresión cuando el aislamiento se exponía a tetraciclina. Se ha reportado una disminución en un 60% de acumulación del antibiótico cuando ambas porinas son silenciadas por mutaciones en *Escherichia coli*, lo que confirmó que tetraciclina puede utilizar las dos porinas y probablemente tenga otro mecanismo de entrada a la bacteria (33). Asimismo, en otro estudio realizado con clortetraciclina en *Escherichia coli* K12 también se observó una regulación negativa de estas porinas cuando la bacteria se enfrentó al antibiótico (124). Con respecto a la segunda banda observada en el gel de acrilamida correspondiente a OmpD, la visualización mayoritariamente de un aumento de expresión puede deberse a un proceso de represión catabólica para aumentar el ingreso de nutrientes frente a una disminución en la expresión de OmpC y OmpF (73) o a la salida de compuestos tóxicos (121). Sin embargo, aún falta mayor investigación sobre esta porina y su relación con tetraciclina, ya que no hay publicaciones al respecto. Ante estos primeros resultados, se recomienda realizar futuros estudios de PCR transcriptasa inversa para obtener datos cuantitativos de expresión proteica y ensayos de mutaciones o silenciamiento genético para evaluar sobrevivencia de los aislamientos ante la pérdida total de las porinas OmpC, OmpF y OmpD.

La última banda representa a la porina OmpA y no presentó variación visible probablemente debido a que es una porina estructural de la cual solo se encontró un reporte vinculado a la exposición con tetraciclina donde hubo un aumento transitorio de la expresión de OmpA cuando el organismo se volvió resistente a 4 mg/L de tetraciclina, tal vez porque a medida que la exposición aumentaba se reducía la síntesis de proteínas, existiendo una necesidad de fortalecimiento estructural de la envoltura celular. Sin embargo, después de la regulación negativa de las porinas OmpC y OmpF, menos moléculas de antibiótico lograron ingresar a la bacteria, se evitó la inhibición de la síntesis de proteínas y la necesidad adicional de OmpA (174).

La evaluación de la clonalidad de los aislamientos por el dendograma generado mediante la prueba de electroforesis en campo pulsado (PFGE) con la enzima XbaI encontró dos clados principales. El primer clado agrupó cepas que portaban genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)*; y el segundo clado solo se ubicaron aislamientos que portaban *tet(A)*. Estos datos indicarían una

falta de relación clonal en relación al determinante de resistencia, la cual ya ha sido reportada anteriormente (127,128); o también puede ser una limitación de la técnica, ya que PFGE no puede separar eficazmente fragmentos menores a 40 kb (175–177), y muchos plásmidos que portan la resistencia tetraciclina pueden ser menores a ese tamaño (178,179)

Finalmente, de manera presuntiva se puede indicar que la presencia mayoritaria de *tet(A)* en los aislamientos clínicos estudiados puede deberse a alguna de las siguientes razones: 1) el gen se encuentra mayoritariamente inserto en un transposón Tn1721 replicativo que ante una presión por tetraciclina un análisis previo encontró por hibridación hasta nueve copias de la región *tet* en una misma bacteria (180); 2) se encontró mayor similitud de los contigs por secuencias pertenecientes a regiones plasmídicas del Genbank, existen reportes que confirman esta alta asociación por transformación y conjugación comparado con otros genes *tet* (181,182); 3) también es probable que la presión selectiva de la mayoría de los aislamientos sea con derivados de tetraciclina, exceptuando minociclina, porque hasta el momento solo *tet(B)* se ha reportado como gen que otorga resistencia a minociclina (182,183). Sin embargo, para confirmar estas teorías se requieren estudios de hibridación, transformación, conjugación y un análisis epidemiológico exhaustivo sobre el uso de la tetraciclina y sus derivados en la cadena alimenticia, en el rubro veterinario y en la aplicación humana dentro del territorio colombiano.

## CONCLUSIONES

- En los aislamientos analizados se demostró que el gen *tet(A)* es predominante en un 60.0% seguido de *tet(G)* en un 14.0% y *tet(B)* en un 7.3%. Sin embargo, estos valores varían dependiendo de la procedencia del aislamiento siendo notorio que en cepas recuperadas de hemocultivo existe mayor presencia de *tet(G)*.
- Los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)* se asociaron a Tn1721, Tn10 y SGII respectivamente. Cada una de estas plataformas se caracterizan por tener una diferente tasa de diseminación y podría explicar mayor predominancia de un gen sobre otro.

- Existe mayor presencia de IncFII en aislamientos de hemocultivo, y más IncA/C en materia fecal. Esta diferencia sugiere diferentes ancestros evolutivos y/o estar vinculado con virulencia.
- Los rearrreglos únicos asociados a los genes *tet(A)* y *tet(B)* respectivamente, sugieren una estructura genética diferenciada en la población de *S. Typhimurium* y otras enterobacterias colombianas.
- La expresión de proteínas de membrana externa sometidas a tetraciclina resultó en una menor expresión de OmpF/C y una mayor expresión de OmpD. Se requieren estudios posteriores de transcripción para determinar la implicancia en la resistencia a tetraciclina en *Salmonella Typhimurium*.
- La falta de clonalidad sugiere que la transferencia horizontal de los genes *tet* es la causa principal de la distribución generalizada de la resistencia a la tetraciclina.

## PERSPECTIVAS

- Para confirmar la transferencia horizontal de los determinantes de la familia *tet* se requieren estudios de transformación y/o conjugación.
- Evaluar más aislamientos de *S. Typhimurium* y otras enterobacterias para estudiar la dispersión de los rearrreglos colombianos de resistencia a tetraciclina.

- Investigaciones posteriores en virulencia podrían determinar si una mayor presencia de plásmidos del grupo IncFII confieren virulencia a los aislamientos de hemocultivo.
- Se requieren estudios posteriores de transcripción para determinar el papel de OmpD en la resistencia a tetraciclina en *Salmonella Typhimurium*.

## LITERATURA CITADA

1. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*. 2010 Mar 15;50(6):882–889.
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318–327.
3. Cartwright EJ, Nguyen T, Melluso C, Ayers T, Lane C, Hodges A, et al. A Multistate Investigation of Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* Serotype I 4,[5],12:i:- Infections as Part of an International Outbreak Associated with Frozen Feeder Rodents. *Zoonoses Public Health*. 2016 Feb;63(1):62–71.
4. Schofield FW. *Salmonella* infections of domestic animals: their relationship to salmonellosis (food infection in man). *Can J Comp Med Vet Sci*. 1945 Mar;9(3):62–68.
5. OMS | *Salmonella* (no tifoidea). WHO [Internet]. 2017 [cited 2018 Apr 6]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
6. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9th edition. A Waverly Company Williams .... 1994;

7. Le Minor L, Popoff MY. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. *Int J Syst Bacteriol.* 1987 Oct 1;37(4):465–468.
8. Grimont P, Weill F-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 2008;1–167.
9. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 2014 Sep;165(7):526–530.
10. Gal-Mor O, Boyle EC, Grassl GA. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front Microbiol.* 2014 Aug 4;5:391.
11. Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest.* 2001 Apr;107(7):775–780.
12. Ruby T, McLaughlin L, Gopinath S, Monack D. *Salmonella*'s long-term relationship with its host. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 May;36(3):600–615.
13. Sánchez M, Cardona N. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio.* 2003;
14. Kazemi M, Gumpert G, Marks MI. Clinical spectrum and carrier state of nontyphoidal salmonella infections in infants and children. *Can Med Assoc J.* 1974 Jun 8;110(11):1253–1257.
15. Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol.* 2007 Mar;85(2):112–118.
16. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis.* 2001 Jan 15;32(2):263–269.
17. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsrose S, Lo Fo Wong DMA, Jensen AB, Wegener HC, et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health

- Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis.* 2011 Aug;8(8):887–900.
18. Anderson ES. Drug resistance in salmonella typhimurium and its implications. *BMJ.* 1968 Aug 10;3(5614):333–339.
  19. Yang SJ, Park KY, Seo KS, Besser TE, Yoo HS, Noh KM, et al. Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* identified by multiplex PCR from animals. *Journal of veterinary science (Suwon-si, Korea).* 2001;
  20. Thung TY, Mahyudin NA, Basri DF, Wan Mohamed Radzi CWJ, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. *Poult Sci.* 2016 Aug 1;95(8):1888–1893.
  21. Faldynova M, Pravcova M, Sisak F, Havlickova H, Kolackova I, Cizek A, et al. Evolution of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains isolated in the Czech Republic between 1984 and 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jun;47(6):2002–2005.
  22. Rabsch W, Tschäpe H, Bäumlér AJ. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect.* 2001 Mar;3(3):237–247.
  23. Helms M, Ethelberg S, Mølbak K, DT104 Study Group. International *Salmonella Typhimurium* DT104 infections, 1992-2001. *Emerging Infect Dis.* 2005 Jun;11(6):859–867.
  24. Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Dec;1241:17–32.
  25. Baltz RH. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the future. *Microbiol.* 2007;2(3):125–131.
  26. Lai JR, Koglin A, Walsh CT. Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry.* 2006 Dec 19;45(50):14869–14879.

27. Hertweck C, Luzhetskyy A, Rebets Y, Bechthold A. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep*. 2007 Feb;24(1):162–190.
28. Stephens CR, Conover LH, Hochstein FA, Regna PP, Pilgrim FJ, Brunings KJ, et al. Terramycin. viii. structure of aureomycin and terramycin. *J Am Chem Soc*. 1952 Oct;74(19):4976–4977.
29. Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Feb;67(3):419–431.
30. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 Jun;65(2):232–60 ; second page, table of contents.
31. Hinrichs W, Kisker C, Düvel M, Müller A, Tovar K, Hillen W, et al. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science*. 1994 Apr 15;264(5157):418–420.
32. Gale EF, Folkes JP. The assimilation of amino-acids by bacteria.' ' XV. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Biochem J*. 1953 Feb;53(3):493–498.
33. Mortimer PGS, Piddok LJV. The accumulation of five antibacterial agents in porindeficient mutants of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 1993;32(2):195–213.
34. Thanassi DG, Suh GS, Nikaido H. Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1995 Feb;177(4):998–1007.
35. Grossman TH. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Apr 1;6(4):a025387.
36. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem*. 2014 May;395(5):559–575.

37. FDA. The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. Federal Register. 2012;
38. Hao H, Cheng G, Iqbal Z, Ai X, Hussain HI, Huang L, et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front Microbiol.* 2014 Jun 12;5:288.
39. Chattopadhyay MK. Use of antibiotics as feed additives: a burning question. *Front Microbiol.* 2014 Jul 2;5:334.
40. Roberts M. Mechanism of resistance for characterized tet and otr genes [Internet]. [cited 2019 Apr 9]. Available from: <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>
41. Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother.* 1992 Mar;29(3):245–277.
42. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.* 1996 Dec;60(4):575–608.
43. Guillaume G, Ledent V, Moens W, Collard J-M. Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. *Microb Drug Resist.* 2004;10(1):11–26.
44. Saenger W, Orth P, Kisker C, Hillen W, Hinrichs W. The Tetracycline Repressor-A Paradigm for a Biological Switch. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2000 Jun 16;39(12):2042–2052.
45. Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Jan;40(1):1–5.
46. Roberts MC, Schwarz S. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms. In: Mayers DL, Sobel JD, Ouellette M, Kaye KS, Marchaim D, editors. *Antimicrobial Drug Resistance.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 231–243.



47. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Dec;47(12):3675–3681.
48. Petersen PJ, Jacobus NV, Weiss WJ, Sum PE, Testa RT. In vitro and in vivo antibacterial activities of a novel glycylicycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):738–744.
49. Arenz S, Nguyen F, Beckmann R, Wilson DN. Cryo-EM structure of the tetracycline resistance protein TetM in complex with a translating ribosome at 3.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015 Apr 28;112(17):5401–5406.
50. Moore IF, Hughes DW, Wright GD. Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX. *Biochemistry.* 2005 Sep 6;44(35):11829–11835.
51. Forsberg KJ, Patel S, Wencewicz TA, Dantas G. The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Chem Biol.* 2015 Jul 23;22(7):888–897.
52. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* 1988 Sep;52(3):375–395.
53. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2227–2238.
54. Lawley T, Frost LS, Wilkins BM. Bacterial Conjugation in Gram-Negative Bacteria †. In: Phillips GJ, Funnell BE, editors. *Plasmid Biology.* American Society of Microbiology; 2004. p. 203–226.
55. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol.* 2002 Nov;46(3):601–610.
56. Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M. Known knowns, known unknowns and unknown unknowns in prokaryotic transposition. *Curr Opin Microbiol.* 2017 Aug;38:171–180.

57. Genética Microbiana [Internet]. [cited 2019 Apr 29]. Available from:  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U6.GeneticaMicrobiana\\_21174.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U6.GeneticaMicrobiana_21174.pdf)
58. Haniford DB, Ellis MJ. Transposons tn10 and tn5. *Microbiol Spectr*. 2015 Feb;3(1):MDNA3–0002.
59. Nicolas E, Lambin M, Dandoy D, Galloy C, Nguyen N, Oger CA, et al. The Tn3family of Replicative Transposons. *Microbiol Spectr*. 2015 Aug;3(4).
60. Campbell NA, Reece JB. *Biology, AP edition*. 2008;
61. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckert A. The Salmonella genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol Microbiol*. 2005 Mar;55(6):1911–1924.
62. Boyd D, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, et al. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol*. 2001 Oct;183(19):5725– 5732.
63. Wiesner M, Zaidi MB, Calva E, Fernández-Mora M, Calva JJ, Silva C. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican Salmonella enterica serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol*. 2009 Jul 3;9:131.
64. Threlfall EJ. Epidemic salmonella typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Jul;46(1):7–10.
65. Ghai I, Ghai S. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infect Drug Resist*. 2018 Apr 11;11:523–530.

66. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Dec;67(4):593–656.
67. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2009 May;1794(5):808–816.
68. Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, et al. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature.* 1992 Aug 27;358(6389):727–733.
69. Liu X, Ferenci T. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of ompF and ompC porin expression under nutrient limitation. *Microbiology (Reading, Engl).* 2001 Nov;147(Pt 11):2981–2989.
70. Cai SJ, Inouye M. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24155–24161.
71. Medeiros AA, O'Brien TF, Rosenberg EY, Nikaido H. Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. *J Infect Dis.* 1987 Nov;156(5):751–757.
72. Lee DR, Schnaitman CA. Comparison of outer membrane porin proteins produced by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1980 Jun;142(3):1019–1022.
73. Santiviago CA, Toro CS, Hidalgo AA, Youderian P, Mora GC. Global regulation of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium major porin, OmpD. *J Bacteriol.* 2003 Oct;185(19):5901–5905.
74. Villagra NA, Valenzuela LM, Mora AY, Millanao AR, Saavedra CP, Mora GC, et al. Cysteine auxotrophy drives reduced susceptibility to quinolones and paraquat by inducing the expression of efflux-pump systems and detoxifying enzymes in *S. Typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 May 29;

75. Leekitcharoenphon P, Hendriksen RS, Le Hello S, Weill F-X, Baggesen DL, Jun SR, et al. Global Genomic Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Apr 4;82(8):2516–2526.
76. Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, et al. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3546–3556.
77. Switt AIM, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathog Dis*. 2009 May;6(4):407–415.
78. Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, et al. Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Jul;76(14):4601–4610.
79. Marus JR, Magee MJ, Manikonda K, Nichols MC. Outbreaks of *Salmonella enterica* infections linked to animal contact: Demographic and outbreak characteristics and comparison to foodborne outbreaks-United States, 2009-2014. *Zoonoses Public Health*. 2019 Feb 28;66(4):370–376.
80. Mellor KC, Petrovska L, Thomson NR, Harris K, Reid SWJ, Mather AE. Antimicrobial Resistance Diversity Suggestive of Distinct *Salmonella* Typhimurium Sources or Selective Pressures in Food-Production Animals. *Front Microbiol*. 2019 Apr 12;10:708.
81. Lee LA, Puhr ND, Maloney EK, Bean NH, Tauxe RV. Increase in Antimicrobial Resistant *Salmonella* Infections in the United States, 1989-1990. *Journal of Infectious Diseases*. 1994 Jul 1;170(1):128–134.
82. Aguilar-Montes de Oca S, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Barba-León J, Vázquez-Navarrete J, Acosta-Dibarrat J, et al. Phenotypic and genotypic profile of

- clinical and animal multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from Mexico. *J Appl Microbiol.* 2018 Jan;124(1):67–74.
83. Reis ROD, Souza MN, Cecconi MCP, Timm L, Ikuta N, Simon D, et al. Increasing prevalence and dissemination of invasive nontyphoidal *Salmonella* serotype Typhimurium with multidrug resistance in hospitalized patients from southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2018 Sep 18;22(5):424–432.
84. Rodríguez EC, Díaz-Guevara P, Moreno J, Bautista A, Montaña L, Realpe ME, et al. Laboratory surveillance of *Salmonella enterica* from human clinical cases in Colombia 2005-2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(7):417–425.
85. Perez-Montaña JA, Gonzalez-Aguilar D, Barba J, Pacheco-Gallardo C, CamposBravo CA, Garcia S, et al. Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot.* 2012 May;75(5):867–873.
86. Granados-Chinchilla F, Rodríguez C. Tetracyclines in food and feedingstuffs: from regulation to analytical methods, bacterial resistance, and environmental and health implications. *J Anal Methods Chem.* 2017 Jan 12;2017:1315497.
87. Frank H Suárez S. PANORAMA MUNDIAL DE LOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO EN AVES [Internet]. [cited 2019 Apr 26]. Available from: <http://referenciasparaconsultoriosmv.com/wp-content/uploads/2018/06/REFERENCIAS36-22-25.pdf>
88. De Salud M, Protección Y. REPÚBLICA DE COLOMBIA ~li [Internet]. [cited 2019 Apr 26]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion1382-de-2013.pdf>

89. Stephens CR, Beereboom JJ, Rennhard HH, Gordon PN, Murai K, Blackwood RK, et al. 6-Deoxytetracyclines. IV. <sup>1,2</sup> Preparation, C-6 Stereochemistry, and Reactions. *J Am Chem Soc.* 1963 Sep;85(17):2643–2652.
90. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother.* 2005 Oct;56(4):611–614.
91. 2018 NEW DRUG THERAPY APPROVALS [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 9]. Available from: <http://www.fda.gov>
92. Fandiño LC, Verjan N. A common *Salmonella* Enteritidis sequence type from poultry and human gastroenteritis in Ibagué, Colombia. *Biomédica.* 2019;
93. Rodríguez R, Fandiño C, Donado P, Guzmán L, Verjan N. Characterization of *Salmonella* from Commercial Egg-Laying Hen Farms in a Central Region of Colombia. *Avian Dis.* 2015 Mar;59(1):57–63.
94. Tuckman M, Petersen PJ, Howe AYM, Orlowski M, Mullen S, Chan K, et al. Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Sep;51(9):3205–3211.
95. Brunelle BW, Bearson BL, Bearson SMD. Chloramphenicol and tetracycline decrease motility and increase invasion and attachment gene expression in specific isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Front Microbiol.* 2014;5:801.
96. Delsol AA, Anjum M, Woodward MJ, Sunderland J, Roe JM. The effect of chlortetracycline treatment and its subsequent withdrawal on multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and commensal *Escherichia coli* in the pig. *J Appl Microbiol.* 2003;95(6):1226–1234.

97. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Mar;73(6):1976–1983.
98. Lindsey RL, Fedorka-Cray PJ, Frye JG, Meinersmann RJ. Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Apr;75(7):1908–1915.
99. Phan MD, Wain J. IncHI plasmids, a dynamic link between resistance and pathogenicity. *J Infect Dev Ctries*. 2008;
100. Chen W, Fang T, Zhou X, Zhang D, Shi X, Shi C. IncHI2 Plasmids Are Predominant in Antibiotic-Resistant *Salmonella* Isolates. *Front Microbiol*. 2016 Sep 30;7:1566.
101. Louden BC, Haarmann D, Han J, Foley SL, Lynne AM. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from food animals in the U.S. *Food Res Int*. 2012 Mar;45(2):968–972.
102. Wiesner M, Fernández-Mora M, Cevallos MA, Zavala-Alvarado C, Zaidi MB, Calva E, et al. Conjugative transfer of an IncA/C plasmid-borne bla CMY-2 gene through genetic re-arrangements with an IncX1 plasmid [Internet]. 2013 [cited 2018 Sep 28]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/264>
103. McMillan EA, Gupta SK, Williams LE, Jové T, Hiott LM, Woodley TA, et al. Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated With United States Food Animals. *Front Microbiol*. 2019 Apr 17;10:832.
104. Allmeier H, Cresnar B, Greck M, Schmitt R. Complete nucleotide sequence of Tn1721: gene organization and a novel gene product with features of a chemotaxis protein. *Gene*. 1992 Feb 1;111(1):11–20.
105. Rotger R, Casadesús J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol*. 1999 Sep;2(3):177–184.

106. Ahmer BM, Tran M, Heffron F. The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol.* 1999 Feb;181(4):1364–1368.
107. Gulig PA, Doyle TJ. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun.* 1993 Feb;61(2):504–511.
108. Silva C, Puente JL, Calva E. *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. *Pathog Dis.* 2017 Jun 22;
109. Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Sep;46(9):2977–2981.
110. Herrero A, Mendoza MC, Threlfall EJ, Rodicio MR. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 Sep;28(9):1087–1093.
111. Chalmers R, Sewitz S, Lipkow K, Crellin P. Complete nucleotide sequence of Tn10. *J Bacteriol.* 2000 May;182(10):2970–2972.
112. Lawley TD, Burland V, Taylor DE. Analysis of the complete nucleotide sequence of the tetracycline-resistance transposon Tn10. *Plasmid.* 2000 May;43(3):235–239.
113. Boyd DA, Peters GA, Ng L, Mulvey MR. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Aug 15;189(2):285–291.
114. Martínez N. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. 2007.
115. Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.* 2006 Jun;8(7):1915–1922.



116. Mather AE, Reid SWJ, Maskell DJ, Parkhill J, Fookes MC, Harris SR, et al. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts. *Science*. 2013 Sep 27;341(6153):1514–1517.
117. Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Demartin M, Weill F-X. Variant *Salmonella* genomic island 1-L antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Newport. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Nov;50(11):3944–3946.
118. Grossman TH, Starosta AL, Fyfe C, O'Brien W, Rothstein DM, Mikolajka A, et al. Target- and resistance-based mechanistic studies with TP-434, a novel fluorocycline antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2559–2564.
119. Tuckman M, Petersen PJ, Projan SJ. Mutations in the interdomain loop region of the tetA(A) tetracycline resistance gene increase efflux of minocycline and glycylicyclines. *Microb Drug Resist*. 2000;6(4):277–282.
120. Linkevicius M, Sandegren L, Andersson DI. Potential of tetracycline resistance proteins to evolve tigecycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Feb;60(2):789–796.
121. Santiviago CA, Fuentes JA, Bueno SM, Trombert AN, Hildago AA, Socias LT, et al. The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium smvA, yddG and ompD (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Mol Microbiol*. 2002 Nov;46(3):687–698.
122. Moya-Torres A, Mulvey MR, Kumar A, Oresnik IJ, Brassinga AKC. The lack of OmpF, but not OmpC, contributes to increased antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2014 Sep;160(Pt 9):1882–1892.
123. Chetri S, Singha M, Bhowmik D, Nath K, Chanda DD, Chakravarty A, et al. Transcriptional response of OmpC and OmpF in *Escherichia coli* against differential gradient of carbapenem stress. *BMC Res Notes*. 2019 Mar 14;12(1):138.

124. Lin X, Wang C, Guo C, Tian Y, Li H, Peng X. Differential regulation of OmpC and OmpF by AtpB in *Escherichia coli* exposed to nalidixic acid and chlortetracycline. *J Proteomics*. 2012 Oct 22;75(18):5898–5910.
125. Liu Y-F, Yan J-J, Lei H-Y, Teng C-H, Wang M-C, Tseng C-C, et al. Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. *Infect Immun*. 2012 May;80(5):1815–1822.
126. Viveiros M, Jesus A, Brito M, Leandro C, Martins M, Ordway D, et al. Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Aug;49(8):3578–3582.
127. Koo H-J, Woo G-J. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *Int J Food Microbiol*. 2011 Feb 28;145(2-3):407–413.
128. Belaynehe KM, Shin SW, Yoo HS. Interrelationship between tetracycline resistance determinants, phylogenetic group affiliation and carriage of class 1 integrons in commensal *Escherichia coli* isolates from cattle farms. *BMC Vet Res*. 2018 Nov 12;14(1):340.
129. Muñoz N, Realpe ME, Castañeda E, Agudelo CI. Caracterización por electroforesis de campo pulsado de aislamientos de *Salmonella Typhimurium* recuperados en el programa de vigilancia de enfermedad diarreica aguda en Colombia, 1997-2004. *Biomedica*. 2006 Sep 1;26(3):397.
130. Lahey BB. Public health significance of neuroticism. *Am Psychol*. 2009 Jun;64(4):241–256.
131. Schroeder SA. Antibiotic resistance and transfer factor in salmonella, united states 1967. *JAMA*. 1968 Sep 23;205(13):903.

132. Brunelle BW, Bearson BL, Bearson SMD, Casey TA. Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates Are Resistant to Antibiotics That Influence Their Swimming and Swarming Motility. *mSphere*. 2017 Dec;2(6).
133. El-Tayeb MA, Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, Almaary KS, Elbadawi YB. Prevalence, serotyping and antimicrobials resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. *Braz J Microbiol*. 2017 Feb 14;48(3):499–508.
134. Zishiri OT, Mkhize N, Mukaratirwa S. Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil. *Onderstepoort J Vet Res*. 2016 May 26;83(1):e1–e11.
135. Wain J, Diem Nga LT, Kidgell C, James K, Fortune S, Song Diep T, et al. Molecular analysis of *incHI1* antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Sep;47(9):2732–2739.
136. Riley LW, Blanton RE. Advances in molecular epidemiology of infectious diseases: definitions, approaches, and scope of the field. *Microbiol Spectr*. 2018;6(6).
137. O'Mahony R, Quinn T, Drudy D, Walsh C, Whyte P, Mattar S, et al. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* from food sources in Colombia: evidence for an unusual plasmid-localized class 1 integron in serotypes Typhimurium and Anatum. *Microb Drug Resist*. 2006;12(4):269–277.
138. Santamaría J, López L, Soto CY. Detection and diversity evaluation of tetracycline resistance genes in grassland-based production systems in Colombia, South America. *Front Microbiol*. 2011 Dec 14;2:252.
139. Agudelo C. Informe de *Salmonella* spp 2000-2013. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2014. p. 31.

140. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods*. 2000 Oct;42(2):139–147.
141. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJV, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Feb;53(2):208–216.
142. Institute C and LS. M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017.
143. Guerra B, Soto SM, Argüelles JM, Mendoza MC. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr;45(4):1305–1308.
144. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 1984 Jul;12(1):19–36.
145. Wiesner M, Fernández-Mora M, Cevallos MA, Zavala-Alvarado C, Zaidi MB, Calva E, et al. Conjugative transfer of an IncA/C plasmid-borne bla<sub>CMY-2</sub> gene through genetic re-arrangements with an IncX1 plasmid. *BMC Microbiol*. 2013 Nov 21;13:264.
146. Wiesner M, Calva E, Fernández-Mora M, Cevallos MA, Campos F, Zaidi MB, et al. *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiol*. 2011 Jan 11;11(1):9.
147. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005 Dec;63(3):219–228.
148. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology.

149. Li Y, Pulford CV, Díaz P, Perez-Sepulveda BM, Duarte C, Predeus AV, et al. Genomic and phylogenetic analysis of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variants responsible for invasive endemic infections in Colombia. *BioRxiv*. 2019 Mar 25;
150. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jul;58(7):3895–3903.
151. Puente JL, Juárez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E. The *Salmonella* ompC gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene*. 1995 Apr 14;156(1):1–9.
152. Villarreal JM, Becerra-Lobato N, Rebollar-Flores JE, Medina-Aparicio L, Carbajal-Gómez E, Zavala-García ML, et al. The *Salmonella enterica* serovar Typhi ItrR-ompRompC-ompF genes are involved in resistance to the bile salt sodium deoxycholate and in bacterial transformation. *Mol Microbiol*. 2014 Jun;92(5):1005–1024.
153. Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Apr;70(4):2503–2507.
154. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153 Suppl 1:S347–57.
155. Marquez-Ortiz RA, Haggerty L, Olarte N, Duarte C, Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, et al. Genomic Epidemiology of NDM-1-Encoding Plasmids in Latin American Clinical Isolates Reveals Insights into the Evolution of Multidrug Resistance. *Genome Biol Evol*. 2017 Jun 1;9(6):1725–1741.

156. Yau S, Liu X, Djordjevic SP, Hall RM. RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their *sul2-strA-strB* antibiotic resistance gene cluster. *Microb Drug Resist.* 2010 Dec;16(4):249–252.
157. Gulig PA, Curtiss R. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun.* 1987 Dec;55(12):2891–2901.
158. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2018 May 1;73(5):1121–1137.
159. Zhang Y, LeJeune JT. Transduction of *bla*(CMY-2), *tet*(A), and *tet*(B) from *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Heidelberg to *S. Typhimurium*. *Vet Microbiol.* 2008 Jun 22;129(3-4):418–425.
160. Lee H, Doak TG, Popodi E, Foster PL, Tang H. Insertion sequence-caused large-scale rearrangements in the genome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2016 Sep 6;44(15):7109–7119.
161. Koonin EV, Wolf YI. Constraints and plasticity in genome and molecular-phenome evolution. *Nat Rev Genet.* 2010 Jul;11(7):487–498.
162. Jain A, Srivastava P. Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett.* 2013 Nov;348(2):87–96.
163. Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev.* 2004 Feb;28(1):79–100.
164. Meyer R. Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid.* 2009 Sep;62(2):57–70.
165. Rawlings DE, Tietze E. Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Dec;65(4):481–96, table of contents.

166. Daly M, Villa L, Pezzella C, Fanning S, Carattoli A. Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Apr;55(4):558–561.
167. Hartman AB, Essiet II, Isenbarger DW, Lindler LE. Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of tet(A)-1. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):1023–1032.
168. Polly SM. The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle. *JAMA.* 1993 Jul 21;270(3):384.
169. García P, Malorny B, Rodicio MR, Stephan R, Hächler H, Guerra B, et al. Horizontal Acquisition of a Multidrug-Resistance Module (R-type ASSuT) Is Responsible for the Monophasic Phenotype in a Widespread Clone of *Salmonella* Serovar 4,[5],12:i:. *Front Microbiol.* 2016 May 10;7:680.
170. Nakahara H, Ishikawa T, Sarai Y, Kondo I, Kozukue H. Mercury resistance and R plasmids in *Escherichia coli* isolated from clinical lesions in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977 Jun;11(6):999–1003.
171. Parisa K, Mehran H, Arezoo T. Multi-metal resistance study of bacteria highly resistant to mercury isolated from dental clinic effluent. *Afr J Microbiol Res.* 2011 Apr 30;5(7):831–837.
172. Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ, de Sa JD. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg (Lond).* 1977 Apr;78(2):297–300.
173. Grindley NDF. The Movement of Tn3-Like Elements: Transposition and Cointegrate Resolution. In: Craig NL, Lambowitz AM, Craigie R, Gellert M, editors. *Mobile DNA II.*

American Society of Microbiology; 2002. p. 272–302.

174. Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One*. 2007 Apr 11;2(4):e365.
175. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med*. 1998;15:33–50.
176. Qian F, Germino GG. Introduction to Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). In: Hildebrandt F, Igarashi P, editors. *Techniques in molecular medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999. p. 96–102.
177. PFGE | PulseNet International [Internet]. [cited 2019 Jun 27]. Available from: <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/pfge/>
178. Attéré SA, Vincent AT, Paccaud M, Frenette M, Charette SJ. The Role for the Small Cryptic Plasmids As Moldable Vectors for Genetic Innovation in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Front Genet*. 2017 Dec 15;8:211.
179. Lancashire JF, Terry TD, Blackall PJ, Jennings MP. Plasmid-encoded Tet B tetracycline resistance in *Haemophilus parasuis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 May;49(5):1927–1931.
180. Wiebauer K, Schraml S, Shales SW, Schmitt R. Tetracycline resistance transposon Tn1721: *recA*-dependent gene amplification and expression of tetracycline resistance. *J Bacteriol*. 1981 Sep;147(3):851–859.
181. Frech G, Schwarz S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. *J Appl Microbiol*. 2000 Oct;89(4):633–641.



182. Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Beef Cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Aug 15;81(16):5560–5566.
183. Vilacoba E, Almuzara M, Gulone L, Traglia GM, Figueroa SA, Sly G, et al. Emergence and spread of plasmid-borne tet(B)::ISCR2 in minocycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):651–654.

## ANEXOS

### 1. Protocolo de PCR para el gen *tet(A)*

Tamaño esperado: 577 pb (141)

Oligo Forward	GGT TCA CTC GAA CGA CGT CA
Oligo Reverse	CTG TCC GAC AAG TTG CAT GA

Master mix

Reactivo	Concentración inicial	x1 (µl)
Buffer	10x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5
dNTP	10 mM	0.5
Oligo Forward	10 mM	1.25
Oligo Reverse	10 mM	1.25
Taq polimerasa	5 unidades	0.3
ADN	20 ng/µl	2
Agua		15.7
TOTAL		25

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
95°C	30s	
55°C	30s	
72°C	30s	
72°C	10 min	

## 2. Protocolo de PCR para el gen *tet(B)*

Tamaño esperado: 634 pb (141):

Oligo Forward	CCT CAG CTT CTC AAC GCG TG
Oligo Reverse	GCA CCT TGC TCA TGA CTC TT

Master mix:

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>x1 (µl)</b>
Buffer	10x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5
dNTP	10 mM	0.5
Oligo Forward	10 mM	1.25
Oligo Reverse	10 mM	1.25
Taq polimerasa	5 unidades	0.3
ADN	20 ng/µl	2

Agua		15.7
TOTAL		25

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
95°C	30s	
55°C	30s	
72°C	30s	
72°C	10 min	

### 3. Protocolo de PCR para el gen *tet(G)*

Tamaño esperado: 391 pb (141):

Oligo Forward	AGC AGC CTC AAC CAT TGC CGA T
Oligo Reverse	GGT GTT CCA CTG AAA ACG GTC CT

Master mix:

Reactivo	Concentración inicial	x1 (µl)
Buffer	10x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4
dNTP	10 mM	0.5
Oligo Forward	10 mM	0.6
Oligo Reverse	10 mM	0.6
Taq polimerasa	5 unidades	0.3

ADN	20 ng/μl	2
Agua		14.5
TOTAL		25

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
95°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	90 s	
72°C	10 min	

#### 4. Protocolo de PCR para 'Left junction'

Tamaño esperado: 500 pb (62):

Oligo Forward	ACA CCT TGA GCA GGG CAA AG
Oligo Reverse	AGT TCT AAA GGT TCG TAG TCG

Master mix:

Reactivo	Concentración inicial	x1 (μl)
Buffer	10x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4
dNTP	10 mM	0.5

Oligo Forward	10 mM	0.6
Oligo Reverse	10 mM	0.6
Taq polimerasa	5 unidades	0.3
ADN	20 ng/μl	2
Agua		14.5
TOTAL		25

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
95°C	30 s	
60°C	30 s	
72°C	90 s	
72°C	10 min	

### 5. Protocolo de PCR para 'Right junction' Tamaño esperado: 515 pb (62):

Oligo Forward	TGA CGA GCT GAA GCG AAT TG
Oligo Reverse	AGC AAG TGT GCG TAA TTT GG

Master mix:

Reactivo	Concentración inicial	x1 (μl)
Buffer	10x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4
dNTP	10 mM	0.5

Oligo Forward	10 mM	0.6
Oligo Reverse	10 mM	0.6
Taq polimerasa	5 unidades	0.3
ADN	20 ng/μl	2
Agua		14.5
TOTAL		25

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
95°C	30 s	
60°C	30 s	
72°C	90 s	
72°C	10 min	

## 6. Soluciones para lisis alcalina y aislamiento de plásmidos

Solución 1:

☐ Tris HCl 50 mM pH 8

☐ EDTA 10 mM

Solución 2:

☐ NaOH 0.2N

☐ SDS 1%



## 7. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncA/C

Tamaño esperado: 2 589 pb (146):

Oligo Forward	ACT GAA TTC GCG AAA CTG GGG AAA TGT G
Oligo Reverse	TGT GTC GAC GGT TCG TTC GTT GCG TTT CA

Master mix:

Reactivo	Concentración inicial	x1 (µl)
Buffer	10x	2.5
MgCl <sup>2</sup>	25 mM	4
dNTP	10 mM	1.25
Oligo Forward	10 mM	2.5
Oligo Reverse	10 mM	2.5
Taq polimerasa	5 unidades	0.25
ADN	20 ng/µl	2
Agua		11
TOTAL		25

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
95°C	1 min	
63°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	10 min	

## 8. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncX1

Tamaño esperado: 2 000 pb Secuencia de oligos (145):

Oligo Forward	CTC ATA AGC CCT CCG CTT GTC T
Oligo Reverse	TTT CAC TGC AAA ACA TTT CTT ACG C

Master mix:

Reactivo	Concentración inicial	x1 (µl)
Buffer	10x	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4
dNTP	10 mM	1
Oligo Forward	10 mM	2.5
Oligo Reverse	10 mM	2.5
Taq polimerasa	5 unidades	0.3
ADN	20 ng/µl	2
Agua		10.2
TOTAL		25

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
94°C	45s	
58°C	45s	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

9. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncFII Tamaño esperado: 270 pb (53):

Oligo Forward	CTG TCG TAA GCT GAT GGC
Oligo Reverse	CTC TGC CAC AAA CTT CAG C

Master mix:

Reactivo	Concentración inicial	x1 (µl)
Buffer	10x	1.5
MgCl <sup>2</sup>	25 mM	1.5
dNTP	10 mM	0.3
Oligo Forward	10 mM	0.3
Oligo Reverse	10 mM	0.3
Taq polimerasa	5 unidades	0.12
ADN	20 ng/µl	2
Agua		8.6
TOTAL		15

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
94°C	45 s	
58°C	45 s	
72°C	45 s	
72°C	10 min	

## 10. Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncHI1

Tamaño esperado: 471 pb (147):

Oligo Forward	GGA GCG ATG GAT TAC TTC AGT AC
---------------	--------------------------------

Oligo Reverse	TGC CGT TTC ACC TCG TGA GTA
---------------	-----------------------------

Master mix:

Reactivo	Concentración inicial	x1 (µl)
Buffer	10x	2.5
MgCl <sup>2</sup>	25 mM	3
dNTP	10 mM	0.5
Oligo Forward	10 mM	0.6
Oligo Reverse	10 mM	0.6
Taq polimerasa	5 unidades	0.3
ADN	20 ng/µl	2
Agua		15.5
TOTAL		25

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
94°C	30s	
57°C	45s	
72°C	45s	
72°C	10 min	

11. **Protocolo de PCR para el grupo de incompatibilidad IncHI2**  
Tamaño esperado: 139 pb (147):

Oligo Forward	TTT CTC CTG AGT CAC CTG TTA ACA C
Oligo Reverse	GGC TCA CTA CCG TTG TCA TCC T

Master mix:

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>x1 (µl)</b>
Buffer	10x	2.5
MgCl <sup>2</sup>	25 mM	3
dNTP	10 mM	0.5
Oligo Forward	10 mM	0.6
Oligo Reverse	10 mM	0.6
Taq polimerasa	5 unidades	0.3
ADN	20 ng/µl	2
Agua		15.5
<b>TOTAL</b>		<b>25</b>

Condiciones de corrida:

95°C	5 min	x 30 ciclos
94°C	45s	
58°C	45s	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

## 12. Buffers utilizados en PFGE

Buffer de suspensión celular (BSC) pH 8

- ☒ Tris 100 mM
- ☒ EDTA 1 mM
- ☒ Esterilizar a 121°C por 15 minutos

Buffer de lisis celular (BLC) pH 8

- ☒ Tris 50 mM
- ☒ EDTA 50 mM

☑ Sarcosil 1%

Buffer TE pH 8

☑ Tris 10 mM

☑ EDTA 1 mM

### 13. SDS-PAGE de extracción de proteínas de membrana externa expuestas a tetraciclina

	Cepa referencial	Perfil 1 (64 ug/ml)	Perfil 2 (64 ug/ml)	Perfil 3 (32 ug/ml)	Perfil 4 (32 ug/ml)
	ST 14028	<i>tet(A)</i> (hemocultivo y materia fecal) <i>tet(B)</i> (hemocultivo)	<i>tet(B)</i> (materia fecal)	<i>tet(G)</i> (hemocultivo)	<i>tet(G)</i> (materia fecal)
OmpC/F					
OmpD					
OmpA					
		50% (n=2)	17% (n=1)	17% (n=1)	17% (n=1)