

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Circulación de cepas de *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos en
comunidades remotas de la provincia de Esmeraldas**

Sonia Ontaneda Luna

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Master en
Microbiología

Quito

Octubre de 2005

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Graduado

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Circulación de cepas de *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos en
comunidades remotas de la provincia de Esmeraldas**

Sonia Ontaneda Luna

Gabriel Trueba, PhD.
Director de Tesis (Firma)

Venancio Arana, PhD.
Miembro del Comité de Tesis (Firma)

Marco Fornasini, PhD.
Miembro del Comité de Tesis (Firma)

Víctor Viteri, PhD.
Decano del Colegio de Postgrados (Firma)

Quito, octubre de 2005

© **Derechos de autor**

Sonia Ontaneda Luna

2005

Dedicatoria:

*A mi familia, en especial a mis padres, las personas
más importantes en mi vida.*

Agradecimientos

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron con la realización de este trabajo, y, un agradecimiento especial a los directivos del Proyecto ECODESS-Berkeley que, con su financiamiento hicieron posible el desarrollo del presente estudio.

RESUMEN

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la distribución de las cepas de *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos en comunidades remotas de la provincia de Esmeraldas, Ecuador. Por otra parte, se propuso valorar la influencia de las vías de comunicación en el apareamiento de resistencia a los antibióticos en estas comunidades. Los antibióticos que se utilizaron en el estudio fueron: ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina y cefotaxima. Se aislaron colonias fermentadoras de lactosa de 358 muestras de materia fecal de individuos sanos y enfermos (con diarrea) en 21 comunidades de Esmeraldas. De estos aislamientos, doscientos ochenta y ocho, fueron *Escherichia coli*, las cuales fueron analizadas mediante la técnica de difusión en disco para determinar la sensibilidad a los antibióticos. Para la tipificación molecular de las cepas resistentes, se utilizó la técnica denominada Enterobacteria-repetitive-intergenic-consensus basada en la reacción en cadena de la polimerasa (ERIC-PCR). Ciento dieciocho cepas de *Escherichia coli* (41%) fueron resistentes a al menos uno de los siete antibióticos mencionados anteriormente. La resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli* fue distribuida de la siguiente manera: ampicilina (28.15%), trimetoprim-sulfametoxazol (25.3%), cloranfenicol (6.6%), tetraciclina (33.7%), ciprofloxacino (1%), gentamicina (0%) y cefotaxima (0%). El análisis de ERIC-PCR de los aislados indicaron que las cepas de *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos circularon entre las comunidades. Por otra parte, la construcción de la principal vía de acceso a la zona, parece haber influido de alguna manera en la transmisión de cepas resistentes en los antibióticos en las comunidades estudiadas.

Estadísticamente, no se encontró correlación entre la distancia de las comunidades a Borbón (principal centro comercial de la región), ni de las comunidades a la principal vía de comunicación, con la frecuencia de resistencia a los antibióticos en las comunidades.

Palabras clave: *Escherichia coli*, Resistencia a los antibióticos, Antibióticos, ERIC-PCR, Comunidades

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the distribution of *Escherichia coli* resistant to antibiotics in remote communities of Esmeraldas, a province of Ecuador. On the other hand, it was proposed to assess the influence of roads on the appearance of antibiotic resistant bacteria in these communities. The antibiotics tested were: ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, tetracycline, ciprofloxacin, gentamicin and cefotaxime. Three hundred fifty eight lactose fermenters were isolated from fecal samples from healthy and non healthy (with diarrhoea) persons in 21 villages in Esmeraldas. Two hundred and eighty eight of these isolates were *E. coli*, which were examined for antibiotic susceptibility using a disk diffusion assay. For molecular typing of resistant strains, Enterobacterial-repetitive-intergenic-consensus based on Polymerase chain reaction PCR (ERIC-PCR), was used. A hundred eighteen samples (41%) were resistant to at least one of seven antibiotics. Antimicrobial resistances of *E. coli* were distributed as follows: ampicillin (28.15%), trimethoprim-sulfamethoxazole (25.3%), chloramphenicol (6.6%), tetracycline (33.7%), ciprofloxacin (1%), gentamicin (0%) and cefotaxime (0%). ERIC-PCR analysis of the isolates indicated that antibiotic resistant strains of *Escherichia coli* were circulating among communities. On the other hand, the new road's construction may play an important role in transmission of resistant strains in these communities

Neither distance of communities to Borbon (the commercial center of the region) nor distance from communities to the road were correlated statistically with frequency of antibiotic resistance of communities.

Keywords: Distribution, *Escherichia coli*, Antibiotics, Antibiotic resistance, ERIC-PCR, Communities

Tabla de contenido

Tabla de contenido:	viii
PARTE I	1
<u>1. Antecedentes y significancia</u>	1
1.1 Causas de la diseminación de la resistencia bacteriana a los antibióticos	1
1.2 Resistencia debida al mal uso en clínica	2
1.3 Resistencia debido al uso de medi- camentos en agricultura	4
1.4 Resistencia en comunidades	7
<u>2. Mecanismos genéticos de resistencia bacteriana</u>	10
2.1 Resistencia debida a mutaciones	11
2.2 Transferencia horizontal de genes de resistencia	11
2.2.1 Plásmidos	13
2.2.1 Transposones	14
2.2.3 Fagos	14
2.2.4 Integrones	14
<u>3. Mecanismos biológicos de la resistencia Bacteriana</u>	16

<u>4. Resistencia en enterobacterias</u>	19
<u>5. Uso de técnicas moleculares para la identificación de clones</u>	21
PARTE II	
<u>6. Introducción</u>	23
<u>7. Materiales y métodos</u>	26
7.1 Población en estudio y datos demográficos	26
7.1.1 Diseño del estudio	26
7.2 Recolección y procesamiento de muestras	26
7.3 Análisis de resistencia a los antibióticos	27
7.4 Fingerprinting genómico de las cepas de <i>E. coli</i> por ERIC-PCR	27
7.4.1 Liberación de ADN	27
7.4.2 Amplificación de ADN	28
7.4.3 Electroforesis y análisis de los Geles	28
7.4 Análisis estadístico	28
<u>8. Resultados</u>	30-40

9. Discusión 41-45

Bibliografía 46-51

Anexos: 52-78

Anexo 1. Gráfico No. 1: Disminución en el número de nuevos agentes antimicrobiano

Anexo 2. Tabla No. 7: Porcentaje de resistencia en enterobacterias encontrada en 13 en Hospitales de Quito.

Anexo 3. Mapa de la zona de estudio

Anexo 4. Dendrogramas

Anexo 5. Geles de electroforesis

PARTE I

1. ANTECEDENTES Y SIGNIFICANCIA

1.1 Causas de la diseminación de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

El desarrollo y la transmisión de la resistencia a los antibióticos es de origen multifactorial e incluye relaciones entre el agente antibacteriano, las bacterias, el hospedador y la localización geográfica^{5,32}; sin embargo, los principales factores que promueven este problema comprenden: el uso innecesario, inadecuado y en grandes cantidades de los agentes antibacterianos, tanto en medicina, como en agricultura, ganadería y otras áreas como la acuicultura;^{1,11,14,27} estos puntos serán analizados con mayor detenimiento más adelante. Entre los factores relacionados con el huésped, cabe mencionar: el tipo de bacteria que causa la infección, la habilidad del antimicrobiano para alcanzar el sitio de infección en las concentraciones terapéuticas adecuadas, el mecanismo de acción del antibiótico, la flora normal del huésped, el medioambiente y el estado inmunológico del individuo.^{5,22,34,63} Por otro lado, el uso de antimicrobianos ejerce una presión selectiva que afecta, tanto al medioambiente que nos rodea, como al individuo que vive dentro de este ecosistema.^{5,63}

Es importante resaltar, que el abuso en el uso de antibióticos durante los últimos años ha creado las condiciones necesarias para la propagación de genes de resistencia entre las bacterias.^{11,27,31,34} Algunos estudios sugieren, que existe una relación cuantitativa entre la frecuencia de resistencia y el volumen de antibiótico usado, puesto que, antes de que se empezaran a emplear grandes cantidades de los mismos, las poblaciones bacterianas se mantenían bastante sensibles⁵⁶; de manera que, el uso de antibióticos promovería la remoción de cepas sensibles por las resistentes ya seleccionadas, a este proceso se le conoce con el nombre de “presión de selección”.^{2,32,47,56,67} Sin embargo, si se toma en cuenta que la transmisión de resistencia es un proceso dinámico, el volumen de droga no estaría directamente relacionado con el incremento de resistencia; por ejemplo, si el uso

del antibiótico llega a su fin, se esperaría que los niveles de resistencia declinen notablemente, pero no sucede de esta manera, pues se mantienen.³⁴ Se debe también tomar en cuenta, que el incremento de la resistencia está relacionado con el tiempo de uso de la droga;^{32,67} así por ejemplo, después de un largo tratamiento con antibióticos, la flora intestinal y la de la piel que en un comienzo era sensible a los antibióticos, empezará a ser colonizada por cepas que son resistentes, tanto al antibiótico utilizado, como a otros con estructura diferente; es decir, los antibióticos no sólo generan resistencia en bacterias patógenas, sino también en la flora normal de los individuos o de los pacientes.^{12,32,47}

Cuando un fenotipo resistente se ha sido adquirido, las cepas resistentes son capaces de producir una epidemia por medio de la diseminación de los clones resistentes o de genes de resistencia capturados.^{8,36} Los microorganismos resistentes son capaces de colonizar un gran número de huéspedes, por lo tanto, un huésped puede transferir su resistencia a otros de igual o diferente especie, y especialmente, a aquellos que no han sido tratados con antibióticos, originando de esta forma una epidemia que se expandirá a diferentes localizaciones geográficas.^{8,11,32,36,47} Las cepas resistentes aparecen muy rápido en el medio circundante y en el huésped, sin embargo, la pérdida de genes de resistencia toma un tiempo más largo, aún, en ausencia del antibiótico que ejerce una presión selectiva.^{32,34} Se puede decir, por lo tanto, que la influencia del uso de antibióticos sobre las bacterias sensibles y resistentes es compleja, puesto que, las cepas resistentes no sólo afectan a los individuos que los consumen, sino también a aquéllos que no lo hacen, produciéndose por lo tanto, una elevación en su número y, los individuos, en reservorios de genes de resistencia (ver Gráfico 3), lo cual produce un peligroso desequilibrio ecológico en el medioambiente que nos rodea.^{11,32,67}

Desde el punto de vista ecológico, la cantidad de individuos que consumen un antibiótico en un lugar y en un momento determinado, promueve la selección de resistencia y los efectos que ello conlleva, por lo tanto, no sólo el antibiótico crea la resistencia, sino también la cantidad de individuos que lo reciben contribuyen a la emergencia de la resistencia bacteriana, por lo que, no es lo mismo dar una dosis de antibiótico a una persona o animal que proporcionar la misma dosis a un número mayor

de individuos.^{11,32} A este mecanismo de seleccionar resistencia, se le conoce con el nombre de “densidad de selección”, e involucra a la cantidad de antibiótico que se aplica a un número geográficamente definido de individuos definidos. En este proceso, cada individuo se convierte en una máquina de seleccionar bacterias resistentes que luego serán parte del medioambiente.³²

En el caso de las enterobacterias patógenas y no patógenas, la diseminación de los clones de resistencia entre humanos ocurre principalmente a través de la ruta fecal oral y de los alimentos, especialmente de origen animal.^{27,36} La flora fecal constituye un reservorio importante de genes de resistencia, los cuales pueden ser transferidos a otros microorganismos virulentos, dentro de la misma especie y entre diferentes especies.^{39,70} Las bacterias Gram-negativas y otros microorganismos son capaces de desarrollar eficientes mecanismos, los cuales les permiten evadir los efectos tóxicos que produce el ataque de los antibióticos.^{27,71}

1.2 Resistencia debido al mal uso de antibióticos en clínica.

En relación al uso de antibióticos, existen diferentes elementos que han promovido la proliferación de cepas resistentes, entre éstos es importante mencionar: i) el grave problema de la automedicación,^{29,48,58} el cual en países como Ecuador ocurre con frecuencia, debido principalmente, a las malas políticas de salud, que no tienen las suficientes regulaciones con respecto al expendio de fármacos de uso delicado, los cuales pueden ser adquiridos sin prescripción alguna en farmacias y droguerías. Por otro lado, los problemas culturales, sociales y económicos que aquejan a la población, no le permiten tener acceso en muchos casos ni siquiera a las atenciones primarias de salud (centros y subcentros de salud), y por consiguiente, influyen en esta práctica.^{29,32,48,58} Por otra parte, muchos pacientes no continúan con la terapia antimicrobiana, tan pronto experimentan mejoría en su sintomatología, sin completar el tratamiento prescrito por el médico, ocasionando problemas de reinfección, lo cual facilita la selección de bacterias resistentes.^{2,9} En 1998, los Institutos de Medicina del Ecuador reportaron que aproximadamente el 50 % de los antibióticos prescritos fueron entregados a los pacientes sin ninguna indicación; ii) la administración de antibióticos en dosis subterapéuticas;⁴⁸

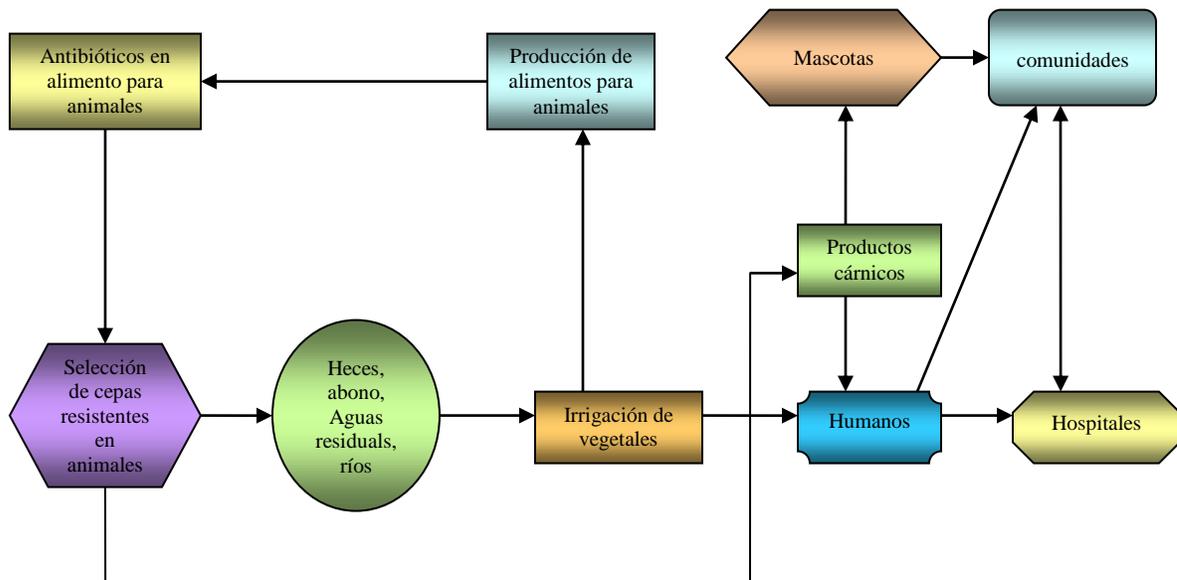
iii) la interrupción repentina del tratamiento; y iv) la prescripción inapropiada de los antimicrobianos (antibióticos) por parte del personal médico, que en muchas ocasiones receta antibióticos para el tratamiento de infecciones, que en la mayoría de los casos son causadas por virus y no por bacterias, como ocurre por ejemplo en aquéllas de tipo respiratorio: resfriados comunes, bronquitis, faringitis, sinusitis y otitis media^{25,28,48,53} o como sucede en el caso de algunas infecciones gastrointestinales, especialmente en aquellas **no complicadas**, causadas por *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, en donde la infección se autolimita, sin embargo, se suele prescribir terapia antibacteriana;^{10,19,24} es decir, la falta de precisión en el diagnóstico contribuye a esta mala práctica médica. Es importante señalar también, que muchos médicos aducen que el exagerado e indiscriminado uso de antibióticos en sus prescripciones, se debe en muchas ocasiones a la presión que sobre ellos ejercen los pacientes. En todo caso, cabe destacar, que una terapia antimicrobiana adecuada y racional es importante para acortar los procesos infecciosos, para reducir su riesgo de transmisión y para disminuir las tasas de resistencia.^{9,53}

1.3 Resistencia debido al uso de antibióticos en agricultura

La diseminación de cepas resistentes a los antibióticos, tal como se describió anteriormente, se debe también en gran parte, al uso indiscriminado de antibióticos en varias formas de agricultura, ganadería y acuicultura, pues se los suele utilizar como promotores o estimuladores de crecimiento en animales (aproximadamente el 90% de los antibióticos que se utilizan en agricultura, son administrados como promotores de crecimiento), como agentes terapéuticos y muchas veces en dosis subterapéuticas, lo cual favorece la selección de bacterias resistentes, que a su vez, se transfieren a poblaciones humanas mediante el consumo de alimentos, haciéndolas más susceptibles de infecciones de difícil tratamiento.^{12,27,29,48} Este hecho se debe, principalmente, a que las mismas cepas resistentes que colonizan el tracto gastrointestinal de los animales utilizados para la producción de alimentos, se han encontrado tanto en sus criadores, como en las poblaciones que los consumen^{5,27} dando como resultado, el emergente problema epidemiológico que enfrenta el campo de la salud en la actualidad (Gráfico No 1). Los primeros en adquirir las cepas resistentes de los animales son sus cuidadores que

permanecen en constante contacto con éstos y con sus heces fecales.⁶⁴ Es importante recalcar, que el tracto gastrointestinal de animales contiene una cantidad elevada de microorganismos comensales, muchos de los cuales viven en mutualismo, en él, también existen diferentes clones de especies como *Escherichia coli*,⁷⁰ considerada como la principal bacteria transportadora de múltiple resistencia en la flora fecal, tanto de humanos como de animales.⁵¹

Gráfico No. 1: Uso de antibióticos en agricultura y ganadería y transmisión de resistencia.

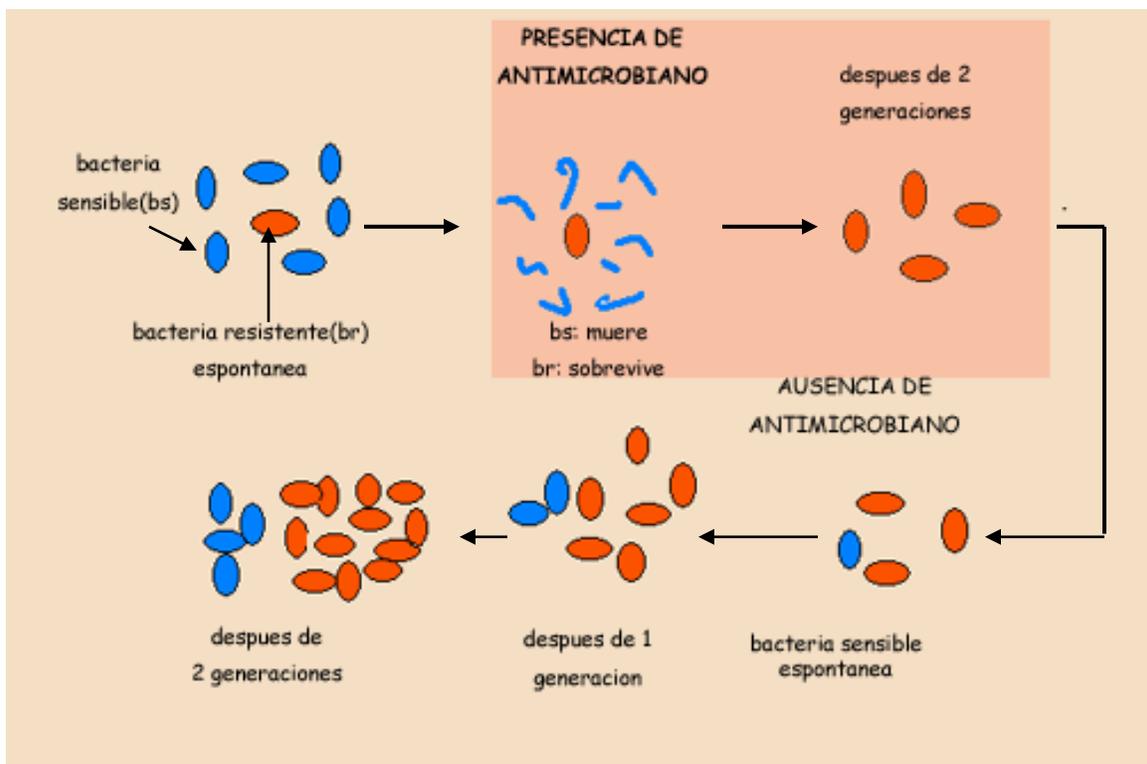


Las bacterias resistentes en animales se mueven en el medioambiente como señalan las flechas en el gráfico hasta llegar a los seres humanos (Ref: George Khachatourians 1999)

La utilización de antibióticos en agricultura también afecta a plantas, suelos, aguas residuales y ríos, donde se los ha encontrado en bajas concentraciones. Algunos ríos llegan a ciudades, en donde sus aguas son previamente tratadas para el consumo humano, sin embargo, a pesar del tratamiento realizado, las trazas de antibióticos que los

contaminan se mantienen.^{5,27} Otra razón para que la diseminación de resistencia suceda es que, cuando los antibióticos son administrados al ganado, las bacterias sensibles mueren por su causa, mientras que las resistentes sobreviven y se reproducen, de modo que, se producen varias generaciones de ellas (Gráfico 2), las cuales se pueden diseminar por transmisión clonal, como sucede en el caso del *Enterococcus*.^{27,64} Los antibióticos también son empleados en plantas, se los utiliza para el tratamiento de enfermedades o infecciones bacterianas que afectan su crecimiento y posterior cosecha, sin embargo, se ha observado que las bacterias que causan estas infecciones adquieren rápidamente resistencia a los bactericidas usados para su tratamiento.²³

Gráfico No. 2: Diseminación de las cepas resistentes a los antibióticos y balance entre bacterias sensibles y resistentes.



En presencia del antibiótico se seleccionan las cepas resistentes que son transmitidas a las siguientes generaciones (Ref: George Khachatourians 1999).

Varios microorganismos han sido causantes de brotes epidémicos a partir de alimentos contaminados, cabe mencionar entre ellos a *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, y algunas cepas de *Escherichia coli* (*E. coli* O157 H:7), éstos se propagaron inicialmente en animales y luego infectaron a seres humanos a través de la cadena alimenticia.^{27,32} Otra bacteria que ha sido transmitida a humanos a través de la cadena alimenticia es el *Enterococcus*,²⁷ es importante acotar, sin embargo, que a pesar de que este microorganismo no constituye un patógeno importante para animales, en humanos es causa de serias infecciones del tracto urinario, del endocardio y de serias e importantes infecciones nosocomiales, esta bacteria ha sido la fuente de cepas resistentes a la vancomicina, además se conoce que presenta con frecuencia resistencia a múltiples antibióticos, tales como: penicilinas, cefalosporinas, lincosamidas y aminoglucósidos.^{35,65,69} Entre los antibióticos que se utilizan con mayor frecuencia en agricultura y ganadería se puede mencionar a la tetraciclina (responsable importante de la selección de cepas resistentes), eritromicina, bacitracina, tilosina espiramicina, virginiamicina (el uso de estos cuatro antibióticos fue prohibido en 1999) y avoparcina entre otros, este último, está asociado con el apareamiento de cepas de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina,³⁰ lo cual constituye un desastre de gran magnitud en el campo de la salud pública, pues según Christopher Walsh (News Feature, Nature 2004 Harvard) “ si las cepas comienzan a ser resistentes a la vancomicina, ellas se harán resistentes a todos los antibióticos.”⁴⁶ Es importante señalar, que el uso de avoparcina fue prohibida tanto en Estados Unidos y Canadá como en algunos países de Europa, debido principalmente a su poder carcinogénico.^{27,69}

1.4 Resistencia bacteriana en comunidades

Reservorios importantes de genes de resistencia, también constituyen las comunidades hospitalarias, donde existen las condiciones ideales para la diseminación de resistencia a los antibióticos, debido principalmente, al elevado número de antibióticos que se utilizan para el tratamiento de diverso tipo de infecciones severas que afectan a pacientes inmuno-comprometidos y a los que se encuentran en las salas de terapia intensiva.^{8,18}

Aunque se conoce que las poblaciones hospitalarias están generalmente colonizadas por cepas resistentes, el estudio realizado por Calva et al. demostró que los niños saludables fueron colonizados e infectados con bacterias resistentes a los antibióticos y que éstas continuaron siendo diseminadas por largo tiempo, aún después de haber concluido la terapia antimicrobiana.⁷ La colonización y posterior infección de los pacientes hospitalizados suele ocurrir en pocos días e inclusive en menos tiempo; y la transmisión de cepas resistentes se produce por la contaminación ambiental y por causa de los propios trabajadores de la salud que portan cepas resistentes.³⁴ Otras condiciones o factores de riesgo que favorecen la prevalencia de resistencia bacteriana en hospitales son: las combinaciones de antibióticos, el número de individuos que reciben las drogas, la densidad poblacional, la hospitalización prolongada, el uso de procedimientos invasivos y el uso de antibióticos inyectables.^{11,34,42} Es importante mencionar además, que en los hospitales las bacterias entéricas, que son responsables por el incremento de infecciones en las unidades de terapia intensiva, son la principal fuente de la resistencia a múltiples antibióticos.^{2,32}

Otros reservorios de cepas resistentes a los antibióticos que favorecen la diseminación de las mismas, constituyen: los grupos grandes de personas o poblaciones, las prisiones, las guarderías, los orfanatos y asilos de ancianos, pues en estos lugares, con frecuencia se suelen utilizar altas cantidades de antibióticos debido principalmente, a que son poblaciones susceptibles a enfermedades infecto-contagiosas que en muchas ocasiones se encuentran hacinadas bajo pobres condiciones sanitarias;^{16,34} de manera que, los portadores que han adquirido las cepas resistentes, usualmente las diseminan en otros grupos poblacionales o comunidades a través de rutas de transmisión normales.^{16,56,67} Por ejemplo, existe una alta frecuencia de cepas de *E. coli* resistentes al trimetoprim (sulfametoxazol) entre los niños que asisten a guarderías.¹⁶ Cabe destacar en este punto, que la presencia de resistencia combinada a trimetoprim y ampicilina y/o piperacilina constituye el inicio del desarrollo progresivo de resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, cefalosporinas y ciprofloxacino;³¹ esta resistencia se encuentra asociada fuertemente a la presencia de integrones, lo cual le permite a la bacteria capturar cassettes adicionales de resistencia en un orden determinado y no al azar.³¹ En general, los niños son los más vulnerables en la adquisición de bacterias resistentes, y a

su vez, ellos las distribuyen dentro del hábitat familiar, de modo que, la transmisión intra-familiar también contribuye con la diseminación de clones con resistencia.^{11,41,56}

La abundancia de los clones de resistencia específicos en poblaciones naturales puede estar ligada a la virulencia que podrían presentar estos clones.³⁶ Existen varios mecanismos comunes implicados en estos dos fenómenos, tal es el caso de los patógenos intracelulares, pues su internalización puede ser causada por la liberación de citoquinas inflamatorias que a su vez producen daños celulares a través de respuestas necróticas y apoptóticas.³⁶ Se conoce también que la localización intracelular puede provocar modificaciones en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), que son el blanco de acción de los antibióticos beta lactámicos, como también en el metabolismo del peptidoglucano, el cual se ve directamente afectado por el medioambiente; por ejemplo, la capa de peptidoglucano de *Salmonella* se afecta considerablemente por el crecimiento intracelular de la bacteria.³³ Se considera, que estos cambios metabólicos podrían alterar la actividad de los estos antibióticos, los cuales actúan evitando el crecimiento de las bacterias durante la infección, por consiguiente, la localización intracelular le permitiría a la bacteria adquirir el fenotipo resistente, es decir, algunos antibióticos podrían seleccionar clones intracelulares.³³ Es necesario señalar sin embargo, que en su mayoría los antibióticos no penetran en la célula. Cuando los antibióticos son activamente acumulados por las células humanas, las bacterias intracelulares estarían en capacidad de incrementar el efecto de los antibióticos en contra de las bacterias patógenas.³³ En algunos casos, las bacterias se mueven de una célula a otra, casi sin tener contacto con el medio extracelular, evitando de esta manera el ataque del sistema inmune, tanto como el contacto con los antibióticos que no penetran a las células de mamíferos.³⁶ Otro ejemplo de virulencia y resistencia, esta relacionado con la formación de capas bacterianas (biofilm: comunidades bacterianas adheridas a superficies).^{33,36} Los biofilms bacterianos son encontrados con frecuencia en enfermedades persistentes o crónicas (Fibrosis quística, causada por *Pseudomonas aeruginosa*) y en el caso de infecciones asociadas a catéteres, prótesis y otros cuerpos extraños.^{33,62} Se conoce que el desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos en los biofilm es de aproximadamente mil veces o más, que lo que sucede con las bacteria planctónicas.^{33,36,62} Sin embargo, aún se desconocen las causas exactas de este mecanismo. Durante los últimos años, un mecanismo relacionado

con genes de resistencia asociados a virulencia bacteriana, lo constituyen los sistemas de bombeo (eflujo) que presentan las cepas multirresistentes (MDR).^{33,36} Al parecer, los sistemas MDR se encuentran distribuidos ampliamente en la mayoría de bacterias, y si bien es cierto, en un comienzo se pensaba que sólo estaban relacionados con la resistencia a los antibióticos, actualmente, se conoce que están involucrados con la virulencia de las bacterias patógenas, estos determinantes MDR son capaces de bombear compuestos involucrados con la defensa del huésped, tienen un papel importante en la señalización intercelular -quorum sensing-, que desencadena la transcripción de varios genes- y, tanto la resistencia bacteriana como la virulencia pueden estar ligadas a un mismo gen.^{33,36}

Se debe tomar en cuenta además, que los organismos resistentes pueden estar presentes en grupos de individuos y de animales que no han estado en contacto con antibióticos, lo que puede ser debido a la densidad de selección en determinada localización geográfica.^{56,67} Un factor de riesgo relevante en la emergencia de la resistencia, lo constituyen las infecciones cruzadas, ya que, los microorganismos se pueden contagiar de una persona a otra, entre animales y entre plantas.¹¹

En las comunidades el problema de la resistencia a los antibióticos se ve influenciado por los portadores de genes de resistencia, que los adquieren principalmente en medio-ambientes hospitalarios^{2,46} y en otros grupos de individuos que son parte de los factores de riesgo para la selección y posterior diseminación de cepas resistentes; como consecuencia, se producirá un impacto en la prevalencia de la resistencia a los antibióticos. Por otro lado, el apareamiento de cepas resistentes en comunidades alejadas de las zonas urbanas se asocia usualmente, al incremento de la frecuencia de las terapias de antibióticos, al incremento de viajes entre los pobladores que se movilizan intra e inter-comunidades,^{9,53,67} al aumento del comercio internacional de alimentos y al aumento de viajeros extranjeros. En el caso de las comunidades remotas y rurales son importantes factores de riesgo, el libre expendio de los fármacos en las farmacias, la falta en muchas ocasiones de personal médico, las malas condiciones sanitarias y de higiene que enfrentan estas poblaciones, la falta de agua potable y la falta de programas con esquemas para uso de antibióticos estandarizados para la cura de enfermedades

infecciosas;^{56,58} sin embargo, como se mencionó previamente, hay estudios que han demostrado que las cepas resistentes son capaces de colonizar a individuos que no toman antibióticos o que no han estado en contacto con otros individuos que albergan cepas resistentes.⁵⁶ La transmisión intrafamiliar de clones de resistencia también afecta a las comunidades, pues ésta suele ocurrir en jóvenes y niños que han sido o no tratados con antibióticos.⁵⁶ La presencia de un simple clon resistente introducido en una comunidad, puede cambiar de manera drástica la prevalencia de la resistencia bacteriana.^{35,71} Un estudio realizado en Nepal indicó las comunidades urbanas son fuentes importantes de flora resistente a los antibióticos y ésta a su vez, se propagará hacia las comunidades rurales.⁶⁷ Según Calva J.et.al., la flora fecal constituye una fuente importante de bacteria resistentes que se diseminan a través de individuos saludables hacia las comunidades.⁷ En definitiva, la presión selectiva que ejerce el uso de antibióticos, parece ser la fuerza que maneja la resistencia en las comunidades rurales.⁵⁶

2. Mecanismos genéticos de resistencia bacteriana

El abuso y la mala utilización de los antibióticos durante las últimas 5 décadas han dado lugar a un cambio en la estructura de las comunidades bacterianas, produciéndose poblaciones bacterianas resistentes a los antibióticos que han ganado una ventaja selectiva frente a las bacterias sensibles.⁵⁹ Por lo tanto, la evolución de la resistencia a los antibióticos es una respuesta lógica frente a la fuerte presión selectiva que ejercen los agentes antibacterianos. De manera que, la administración de los antibióticos promueve la evolución de organismos resistentes con una poderosa ventaja Darwiniana y no Darwiniana; por ejemplo, sólo pocas cepas de *E. coli* resistentes al trimetoprim se encuentran presentes por gramo de materia fecal inicialmente, sin embargo, su número se incrementa drásticamente después del tratamiento con trimetoprim.⁴¹ Para que una bacteria llegue a ser resistente se requiere del ensamblaje de varios genes que trabajen en conjunto para crear el fenotipo resistente, de ahí que, los mecanismos genéticos y bioquímicos que intervienen en la formación de este fenotipo son altamente complejos.³⁴

La resistencia bacteriana puede ser natural o propia de la biología bacteriana, así por ejemplo, *Escherichia coli* tiene una resistencia inherente a la vancomicina; o adquirida, es decir, que habiendo sido sensible se convirtió en resistente a los antibióticos, fenómeno que estaría asociado con la adquisición de ADN extraño o a la acumulación de mutaciones en el genoma bacteriano.^{22,49} Basados en estos procesos, existen varios mecanismos moleculares y biológicos mediante los cuales las bacterias comienzan a ser resistentes a los antibióticos y se diseminan a otras de la misma o de diferente especie:

2.1 Resistencia debida a mutaciones:

La acumulación de mutaciones en secuencias específicas en un mismo o en diferentes genes dará como resultado cepas resistentes o multirresistentes a los antibióticos.^{8,36,49,53} Estos procesos suelen ocurrir al azar a una tasa de 1 nucleótido por gen, cada $10^6 - 10^9$ divisiones celulares en poblaciones normales.^{8,36} Una simple mutación puntual es capaz de causar resistencia, sin que por esta razón se altere la viabilidad de la bacteria y su patogenicidad.⁶³ Sin embargo, en muchas ocasiones, como consecuencia de las mutaciones los genes bacterianos o sus reguladores pueden ser parcialmente modificados dando como resultado a mutantes resistentes, los cuales pueden ser seleccionados por la presión que provoca el uso de antibióticos.^{8,27} El proceso mutacional se puede ver reforzado con los procesos de recombinación, que también juegan un rol importante en la evolución de cepas resistentes a los antibióticos.^{8,36} Un ejemplo que involucra a estos dos mecanismos, lo constituyen las β -lactamasas que confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos de espectro extendido.³⁶ Estas enzimas se producen por mutaciones puntuales en los genes de beta lactamasa que afectan a un reducido número de antibióticos beta lactámicos. Estas mutaciones permiten que las nuevas enzimas hidrolizen a los antibióticos β -lactámicos de espectro extendido provocando su inactividad; de éstas, son muy conocidas las enzimas TEM y SHV, las cuales se han encontrado ampliamente distribuidas en diferentes géneros de enterobacterias, principalmente en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, también se las encuentra en *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y

Neisseria gonorrhoeae.⁶ En el caso de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a múltiples drogas antituberculosas, se conoce que son las mutaciones los mecanismos que generan dicha resistencia.²² Al contrario de lo que sucede en otras bacterias, la resistencia de *M. tuberculosis* parece estar asociada exclusivamente a mutaciones espontáneas producidas en el cromosoma bacteriano, debido a la alta tasa a la que esta bacteria se multiplica dentro de las cavidades pulmonares.⁶¹

2.2 Transferencia horizontal de genes de resistencia

Es importante recalcar que la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos entre bacterias ha jugado un rol importante con graves implicaciones en el campo de la salud. El fenotipo resistente suele ser codificado por genes bacterianos localizados en el ADN cromosomal o plasmídico.⁸ Una vez que los genes de resistencia se han adquirido, éstos pueden movilizarse a otras cepas mediante la transferencia horizontal y vertical de genes.⁸ Cabe aclarar en este punto, brevemente, los conceptos de evolución vertical y horizontal; se denomina **evolución vertical** (transferencia de genes a sus descendientes) a aquella que es manejada por los principios de selección natural, es decir, cuando una mutación espontánea (que produce resistencia al antibiótico) ocurre en el cromosoma bacteriano, la resistencia estará presente en todos los descendientes.²⁷ En presencia de los antibióticos, las bacterias sensibles mueren, mientras que los mutantes resistentes sobreviven, se reproducen y se distribuyen en las poblaciones (ver Gráfico No. 2).²⁷ Por otra parte, **la evolución horizontal** está relacionada con la adquisición de genes de resistencia entre organismos de la misma especie o de diferente especie.^{8,34,40} La transferencia horizontal de genes en las comunidades microbianas es un hecho relevante en la emergencia de nuevas funciones y especies, de manera que, se considera que el “fenómeno de la resistencia bacteriana” es quizá un ejemplo sorprendente del impacto que ha tenido la transferencia horizontal de material genético en el mundo microbiano.⁵⁵

Muchas bacterias han desarrollado resistencia mediante los procesos de selección y mutación, y luego donan estos genes a otras bacterias a través de elementos de intercambio genético como son: plásmidos autotransferibles, ADN desnudo, bacteriófagos, transposones y cassettes genéticos (integrones).^{32,36,50} La transferencia de estos elementos extracromosomales entre diferentes bacterias puede ocurrir mediante mecanismos de conjugación, transformación y transducción.^{20,32} Mientras algunos mecanismos de transferencia horizontal de genes se limitan a especies cercanas, otros, como la transformación, suelen ocurrir entre bacterias de diferente género y especie.²⁷

A continuación se hará una breve descripción de los elementos de intercambio génico y de los mecanismos de la transferencia de genes entre bacterias.

2.2.1 Plásmidos:

Se consideran los principales vectores en la diseminación de genes de resistencia y de determinantes de virulencia en las diversas poblaciones bacterianas.³⁶ Éstos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden conferir resistencia a varios antibióticos a la vez.^{8,13} Intervienen en los mecanismos de conjugación, por lo que se los denomina plásmidos conjugativos, pues participan en la transferencia de genes en varios medio-ambientes, se caracterizan además por ser altamente promiscuos.^{8,13} En la actualidad se conoce que la transferencia plasmídica es mejorada por eficientes donadores bacterianos llamados “brokers”, los cuales se encargan de transferir plásmidos a alta frecuencia a células receptoras de diferente especie o género.⁸

2.2.2 Transposones:

Son elementos móviles que tienen un rol muy importante en la diseminación de genes de resistencia y al igual que los plásmidos, también movilizan determinantes de virulencia.³⁶ Los transposones son segmentos de ADN que se

pueden movilizar de un lado a otro en el genoma bacteriano,¹³ la mayoría de estos elementos móviles en bacterias se transponen directamente como ADN. Éstos segmentos de ADN (conocidos también como secuencias de inserción) que se transponen, generalmente se encuentran flanqueados por secuencias o repeticiones invertidas, las cuales son reconocidas por una proteína llamada transposasa que facilita la movilización del transposón dentro del genoma bacteriano.²⁶ Los transposones bacterianos más comunes son los genes de resistencia a los antibióticos y se puede decir que la adquisición del fenotipo resistente ocurre con frecuencia durante los procesos evolutivos de los transposones.³⁶

2.2.3 Fagos:

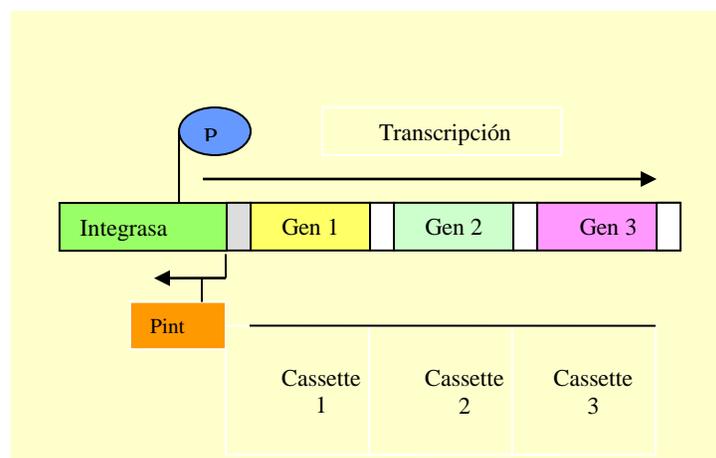
Son elementos que infectan diferentes especies bacterianas con determinantes de virulencia y mediante el proceso de transducción promueven la resistencia a los antibióticos en bacterias; por su capacidad de interactuar con bacterias, se les conoce con el nombre de bacteriófagos.³⁶

2.2.4 Integrones:

Si bien es cierto, es muy conocido el importante papel que juegan en la resistencia y multirresistencia a los antibióticos los plásmidos y transposones, durante los últimos años ha surgido un nuevo elemento en el proceso evolutivo de resistencia, denominado integrón. Los integrones son elementos naturales, o mosaicos compuestos de secuencias de fagos y transposones que han sido involucrados en la diseminación de genes de resistencia mediante transferencia horizontal.^{37,54} Tienen la capacidad de adquirir e intercambiar segmentos de ADN exógeno conocidos como cassettes de genes (marcos de lectura abiertos), los cuales son capaces de integrarse a nuevos genes provenientes de diferentes fuentes y expresar genes de resistencia a los antibióticos.^{20,36,37} Los integrones participan en un sistema de recombinación específica, por lo tanto, contienen

sitios específicos de integración para los genes de resistencia,²¹ (Gráfico 3) se los considera además, como la principal fuente de multiresistencia en las bacterias Gram-negativas, aunque también se los ha encontrado en bacterias Gram positivas.^{32,37} Por otro lado, los integrones se pueden encontrar formados por determinantes de virulencia.³⁶ La diseminación de los integrones se realiza a través de plásmidos y transposones.

Gráfico No. 3: Estructura de un integrón.

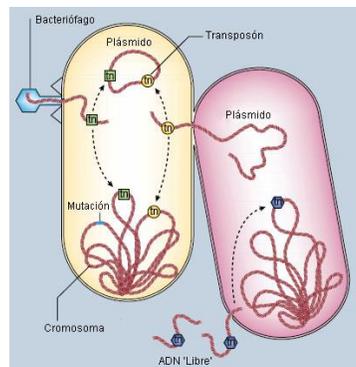


Los integrones están formados por un gen de integrasa seguido de un sitio primario de recombinación *att* (cuadro plomo) y varios cassettes cada uno de los cuales incluye un gen y un sitio de recombinación de 59 bp (cuadros blancos). La transcripción es controlada por un promotor fuerte P, mientras que la integrasa se transcribe por acción de un promotor Pint. (Ref 36. Martínez-Baquero 2002).

Los mecanismos a través de los cuales las bacterias intercambian genes en la naturaleza son: conjugación, transducción y transformación (Gráfico No. 5). La **conjugación** se produce entre dos células y la transferencia unidireccional del material genético se realiza por medio de una estructura conocida como pili sexual desde la célula donadora hacia la receptora.¹³ Este mecanismo se considera como el más importante dentro la transferencia horizontal de genes. Durante el proceso de **transducción**, un bacteriófago transfiere genes a las bacterias receptoras.³⁶ En la **transformación**, el ADN es adquirido directamente desde el medioambiente (exógeno) y luego se recombina dando lugar a un nuevo fenotipo (recombinante), tanto las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son

capaces de capturar el ADN extraño e incorporarlo a su genoma mediante la expresión de un pili o de proteínas que se asemejan a esta estructura, es de esta forma como también se adquieren los genes resistencia a los antibióticos.¹⁴ En definitiva, la transferencia de ADN de una bacteria a otra es un hecho de suma importancia en la evolución del mundo microbiano, y en el campo de la medicina, puesto que, este mecanismo es el responsable de la diseminación de determinantes de resistencia entre las diferentes especies bacterianas.

Gráfico No. 5: Mecanismos genéticos de la diseminación de la resistencia.



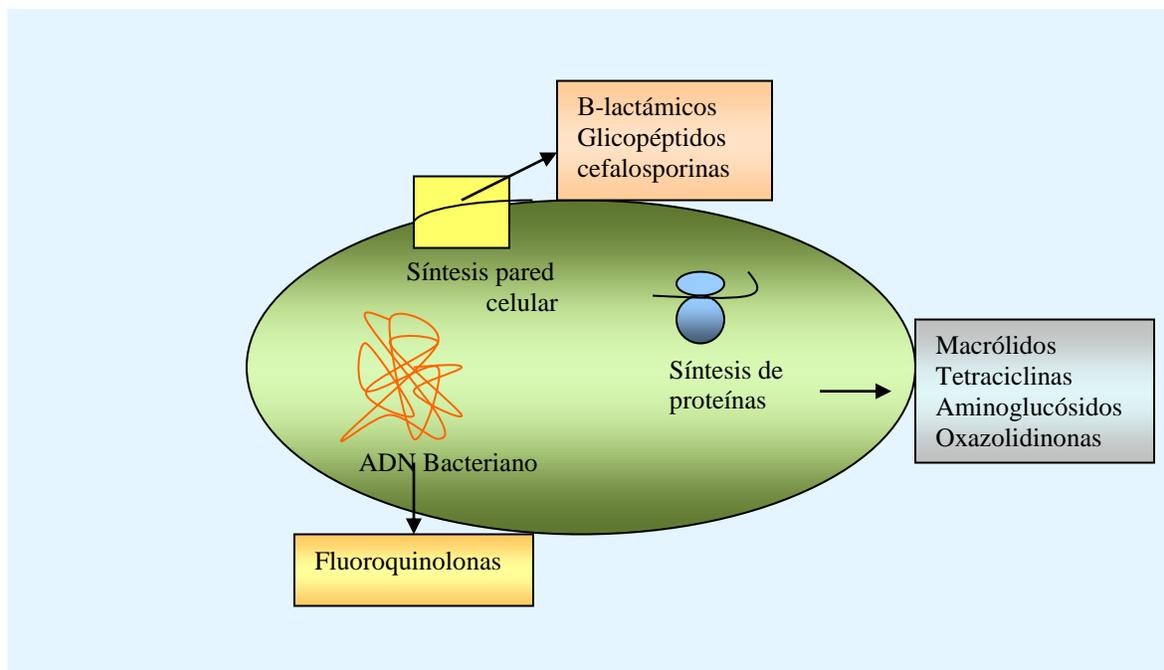
Los genes de resistencia se diseminan a través de varios elementos: plásmidos, transposones, bacteriófagos, ADN desnudos e integrones. (Ref: Stuart Levy & Bonnie Marshall. 2004)

3. Mecanismos biológicos de la resistencia bacteriana

La eficacia de los antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas, depende principalmente del mecanismo de toxicidad selectiva, es decir, de la capacidad que tiene del antibiótico para atacar estructuras bacterianas sin causar daño, o sólo causar pocos efectos adversos sobre las células del huésped infectado.²⁵ Para realizar una terapia antibacteriana, como ya se había mencionando antes, se deben tomar en consideración los siguientes criterios: factores relacionados con el huésped y el fármaco, sitio de la infección, efectos secundarios que puede causar el antibiótico, y la identificación del microorganismo que promueve la infección.^{5,22,34}

En el caso de la resistencia bacteriana, la actividad del antibiótico trata de ser bloqueada a través del mecanismo de resistencia creado por el microorganismo, de modo que es muy importante conocer los mecanismos de acción de los antibióticos y los procesos por medio de los cuales las bacterias actúan en contra de los mismos. Los antibióticos tienen actividad bactericida (matan a los microorganismos) y/o bacteriostática (inhiben el crecimiento de los microorganismos).⁶⁶ El espectro de acción de los antimicrobianos puede ir de reducido a amplio, esto se refiere a la cantidad de especies bacterianas que pueden ser afectados por los antibióticos. En la actualidad, para atacar nuevos blancos de acción en las bacterias, se están creando nuevas drogas con moléculas sintéticas con amplio espectro y potencia.⁶⁶ Con estas medidas, la medicina y la industria farmacéutica pretenden frenar de alguna manera las estrategias de resistencia que las astutas e inteligentes bacterias crean para protegerse de cualquier molécula química que vaya dirigida en contra ellas. Los principales centros de ataque en las bacterias por parte de los antibióticos son: la pared celular bacteriana, las proteínas y el ADN. (Gráfico No. 6).

Gráfico No. 6: Blancos de acción de los antibióticos.



Los agentes antibacterianos actúan sobre la pared celular, proteínas y ADN bacteriano (Ref. C.Walsh 2000).

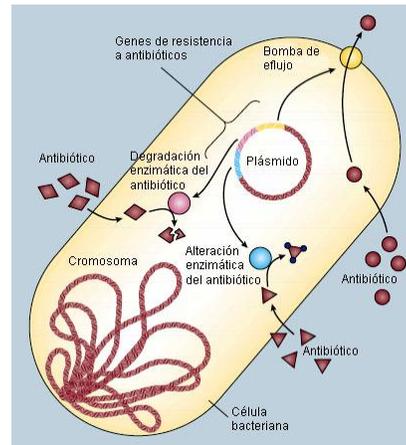
Los antibióticos que actúan sobre la pared celular lo hacen **inhibiendo la síntesis de peptidoglucano**, el momento en que se forman los enlaces cruzados de la pared celular por acción catalítica de transpeptidasas y transglicosilasas.⁶⁶ El grupo de antibióticos que tiene acción sobre la biosíntesis de la pared celular son los beta-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas). Los antibacterianos también actúan sobre la síntesis de proteínas a nivel de la estructura ribosomal de las bacterias, se incluyen en este grupo: aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, oxazolidinonas, y por último, tenemos a los fármacos que interrumpen la replicación del ADN, dentro de este grupo se encuentran las fluoroquinolonas, trimetoprim- sulfametoxazol y metronidazol.^{32,66}

Los principales mecanismos por medio de los cuales las bacterias combaten a los antibióticos (Gráfico No. 7) son:^{22,25,32,66}

- ❖ Inactivación enzimática del antibiótico: Los antibióticos son destruidos por enzimas que son producidas por las bacterias, por ejemplo: Las β -lactamasas destruyen a penicilinas y cefalosporinas por hidrólisis del anillo beta-lactámico. Las esterases hidrolizan a los aminoglucósidos.
- ❖ Impermeabilidad de la pared celular: Se produce por modificación de las porinas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Ejemplo, se impide el ingreso de β lactámicos, quinolonas y otros antibióticos. (Se relaciona con mecanismos intrínsecos de resistencia en algunas especies bacterianas). En muchas bacterias, este mecanismo, constituye parte de los mecanismos de resistencia intrínsecos que pueden presentar frente al ataque de los antibióticos
- ❖ Modificación química del blanco sobre el cual actúa el antibiótico. Ejemplos de este mecanismo son las alteraciones producidas en las subunidades 30S y 50S del ribosoma bacteriano que median en la resistencia a los aminoglucósidos, macrólidos y cloranfenicol. Los cambios producidos en las proteínas ligadoras de penicilina (PBP) promueven la resistencia a los antibióticos beta-lactámicos. La resistencia a la penicilina entre los *Streptococcus pneumoniae* se relacionan con los cambios en la PBP.
- ❖ Expulsión del antibiótico por un mecanismo de transporte activo (eflujo). Este mecanismo se encuentra en la mayoría de las bacterias, así por ejemplo, está

presente en bacterias como *Pseudomonas*, *E. coli*. Las tetraciclinas se encuentran entre los antibióticos que son expulsados por este sistema.

Gráfico No. 7: Mecanismos bioquímicos de resistencia a los antibióticos.



En la gráfica se observan los principales mecanismos por medio de los cuales las bacterias impiden el ataque de los antibióticos. (Ref: Stuart Levy & Bonnie Marshall. 2004)

4. Resistencia a los antibióticos en Enterobacterias

Los problemas de resistencia a múltiples antibióticos se detectaron por primera vez en enterobacterias, como *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*.¹ Muchas bacterias entéricas, como *Enterobacter*, *Klebsiella*, y otras no entéricas, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* son la causa de infecciones nosocomiales que producen importantes brotes epidémicos en la población hospitalaria debido a la presencia de múltiples genes de resistencia a diferentes antibióticos.^{1,3} La mayoría de los patógenos entéricos comparten la presencia de múltiples genes de resistencia a los antibióticos²⁷ y su diseminación en una población se encuentra relacionada a elementos de ADN, como plásmidos y transposones los cuales se han asociado a elementos denominados integrones.^{14,18} Los integrones se encuentran ampliamente distribuidos en enterobacterias y pseudomanales, tanto en muestras clínicas, como en las comunidades.^{18,47} Por otro lado, múltiples mutaciones pueden ser acumuladas en una sola bacteria, de manera que,

esto dará lugar a la formación de cepas con resistencia múltiple.³ La diseminación de un único clon predominante en las diferentes poblaciones, también favorece la resistencia a múltiples antibióticos en enterobacterias. Según el estudio realizado por Leverstein M. et.al., la adquisición de múltiples genes de resistencia es mediada por integrones y, no es un proceso que ocurre al azar, así lo demuestran los modelos de resistencia que se observan en *E. coli*, *Proteus mirabilis* y especies de *Klebsiella*, pues estos son casi idénticos, por consiguiente, estas especies tendrían los mismos mecanismos de adquisición de múltiples genes de resistencia.¹⁸

Escherichia coli es considerada como la enterobacteria más importante de la flora intestinal de humanos y animales, sin embargo, a pesar de pertenecer a la flora comensal del tracto gastrointestinal, puede ser causante de enfermedades en el tracto gastrointestinal, en el tracto urinario y sistema nervioso central en huéspedes inmunocomprometidos.⁵⁶ Las cepas que producen problemas diarreicos han sido clasificadas en diferentes categorías: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica, (EHEC), enteroinvasiva (EIEC) y enteroagregativa (EAEC).^{56,57} Este grupo de bacterias patógenas constituye la principal causa de diarrea en la población infantil en el mundo.^{34,56}

La flora fecal tanto de humanos como de animales, representa un gran potencial de genes de resistencia a los antibióticos, así como también, es el lugar donde se produce una importante transferencia de genes de resistencia entre la flora comensal o no patogénica y los microorganismos patógenos,³⁴ además, los genes de resistencia se diseminan entre diferentes organismos de las mismas o diferentes especies.¹ Algunas de estas cepas resistentes pueden haber sido originadas por el consumo de alimentos previamente tratados con antibióticos.⁵⁸ La gran cantidad de *E. coli* existente, hace que éstas se conviertan en los principales medios de transporte de genes de resistencia entre las poblaciones humanas, animales y el medioambiente.^{22,49} La alta prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes encontrada en la flora normal es usada como indicador de resistencia a los antibióticos en las comunidades.¹⁷ Se conoce además, que los mismos clones resistentes a múltiples antibióticos en la flora fecal son los que producen las epidemias de

infecciones de vías urinarias en diferentes comunidades,^{22,39,59} así por ejemplo, el mismo clon de *E. coli* O15:K52:H1 causó un brote epidémico de cistitis, pielonefritis y septicemia en Londres (1987) y en Barcelona (1988).³⁹

Con el fin de explicar la forma de cómo la infección de vías urinarias causada por *E. coli* puede provenir de cepas que se encuentran en el intestino de humanos, se han promulgado dos teorías: La **teoría de la prevalencia**, la cual sostiene que cepas fecales numéricamente dominantes de *E. coli* son las que probablemente infectan el tracto urinario; y, la **teoría de la patogenicidad especial**, que sostiene que un grupo especial de la microflora intestinal que expresa marcadores de virulencia específicos es el que con mayor probabilidad causa las infecciones de vías urinarias.⁵⁷ Los estudios realizados por Schlager et al., con el fin de investigar la diversidad clonal de *E. coli* que coloniza tanto el tracto gastrointestinal como el tracto urinario cuando ocurre una infección, sostienen que hay una media de 2 a 3 clones de *E. coli* por muestra de heces fecales, mientras que, el promedio de duración de estos clones en las muestras de heces fecales es de 1.6 semanas.⁵⁷ De tal manera que, un clon dominante podía ser encontrado en un alto porcentaje (93 %) en las muestras de heces analizadas.⁵⁷ Cuando los clones dominantes estaban presentes en heces fecales, también podían estar presentes en la periuretra y como consecuencia, causar una infección de vías urinarias.⁵⁷ Estos resultados han servido de soporte para la realización de estudios de clonalidad de *E. coli* en los intestinos de humanos y animales sanos (ej. grupos clonales de resistencia). Según Manges A.R et al., un solo grupo clonal de *E. coli* puede contribuir en el incremento de resistencia en los aislados de *E. coli* de pacientes con infección de vías urinarias.³⁹

5. Uso de técnicas moleculares para identificación de clones

Varias técnicas moleculares han sido importantes en el esclarecimiento de las vías de transmisión que son esenciales en la diseminación de patógenos resistentes. Berge et.al usaron electroforesis de campo pulsado (PFGE) para demostrar la rápida transmisión de cepas multiresistentes de *Salmonella Newport* a través de los Estados Unidos en un periodo de 14 años.⁴ Su estudio mostró un alto grado de correlación entre algunos

modelos de sensibilidad a los antibióticos y el fingerprinting (huella digital) basado en el ADN de las cepas. Otros estudios han demostrado la evidencia de que algunas resistencias son clonales.¹¹ Por ejemplo, varios estudios descubrieron una diseminación significativa de un simple grupo clonal (grupo clonal A) de *E. coli* responsable de la resistencia al Trimetoprim-sulfametoxazol (38-51%) en California, Michigan, y Minnesota.³⁵ Otros estudios, también han encontrado grupos de casos de similar tipo genético, así por ejemplo, cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.⁴²

En el presente estudio se utilizaron cepas de *Escherichia coli*, aisladas a partir de muestras de pacientes con y sin diarrea en la población de Borbón, las cuales fueron sujetas a pruebas de sensibilidad antibiótica (Kirby-Bauer) y ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa) para generar fingerprintings genómicos a partir de ADN de *E. coli*. La distribución de las secuencias repetitivas en enterobacterias, proporciona información acerca de similitudes genéticas de las cepas bacterianas.^{38,59} La técnica molecular empleada sirvió para identificar los clusters (agrupamientos) de las diferentes cepas resistentes y de esta manera ver como se movilizaron dentro de la población analizada.

CIRCULACIÓN DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS EN COMUNIDADES REMOTAS DE LA PROVINCIA DE ESMERALDAS

II PARTE

6. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la tasa de resistencia bacteriana a los antibióticos se ha incrementado de manera alarmante, por lo que, este hecho se ha convertido en un serio problema de salud pública en áreas urbanas, peri-urbanas, rurales y en el mundo entero.^{7,16,23} La pérdida de efectividad de los antibióticos frente a las bacterias comenzó casi desde la introducción de la penicilina. Las primeras cepas resistentes a los antibióticos aparecieron en los hospitales, lugares en donde se hace uso de la mayoría de antibióticos.²⁶ Un ejemplo de ello, constituye la resistencia que presentó el *Staphylococcus aureus*, uno de los primeros patógenos nosocomiales.^{10,16,26,57} La determinación de la sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos de las bacterias aisladas a partir de muestras clínicas es de vital importancia para el control y tratamiento de pacientes infectados¹⁶, sin embargo, la rápida evolución de mecanismos de resistencia, ha limitado la eficacia de estos agentes terapéuticos^{16,17}, y, por consiguiente, el tratamiento de las enfermedades infecciosas se ha hecho cada vez más difícil y costoso. Como consecuencia de la gran epidemia de cepas resistentes, se ha producido un aumento importante en las tasas de morbi-mortalidad, un riesgo incrementado de efectos colaterales y en los costos de los cuidados de salud; esto sucede principalmente, en pacientes hospitalizados.^{11,13,26,34}

La resistencia a los antimicrobianos ha dado lugar a la introducción de una avalancha de nuevas familias de antibióticos y nuevas generaciones de las mismas, que son utilizadas de manera irracional y que contribuyen a la formación de cepas multirresistentes.¹⁶ Son

estas cepas, las responsables del incremento en el número de infecciones en las unidades de cuidados intensivos en hospitales, guarderías y otras comunidades.² Se conoce que cada año se producen millones de agentes antimicrobianos, de los cuales, aproximadamente el 60 % son consumidos por humanos, y el 40 % restante es utilizado en agricultura,^{5,16} sin embargo, según A.E van den Bogaard et.al, en Holanda el consumo de antibióticos en animales es mucho más alto (300.000 Kg) que lo que sucede en humanos (80.000 Kg).⁵³ Se estima además, que el impacto económico de la resistencia bacteriana es de alrededor de cientos de millones de dólares cada año, y depende del número de muertes ocasionadas.^{5,26} Sin embargo, a pesar del incremento en la frecuencia de la resistencia a los antibióticos existentes, la producción de nuevos antimicrobianos ha disminuido durante los últimos años,³⁷ tal como lo demuestra el Anexo No. 1, debido principalmente, a que las poderosas industrias farmacéuticas que manejan el mercado de fabricación de medicamentos, encuentran más rentable producir fármacos para tratamientos de larga duración y para enfermedades crónicas, que para tratamientos cortos causados por infecciones bacterianas, además, el costo para producción de nuevos antimicrobianos es bastante elevado y toma un largo tiempo desarrollarlos para sacarlos finalmente al mercado.^{16,37} El problema se agrava más en las regiones de mayor pobreza en el mundo, en donde, la escasez de estos fármacos es aún mayor de lo que sucede en los países ricos, aunque el problema de resistencia sigue siendo el mismo en ambos casos.³⁷

En resumen, la alarma frente a las cepas resistentes es generalizada, puesto que, muchos de los antibióticos a los cuales se tenía acceso hace algunos años atrás ya no son útiles en la actualidad, y, enfermedades tan graves como la tuberculosis, la meningitis, la neumonía hoy en día son muy difíciles de tratar. Es importante mencionar además, que uno de los problemas de mayor gravedad en la actualidad son las cepas de *Staphylococcus* resistentes a la vancomicina, ya que este antibiótico constituía la última alternativa para el tratamiento de *Staphylococcus* resistentes a la metilina.^{41,51,59} Otros microorganismos comunes, tales como: enterobacterias, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus pneumoniae*, tienen el gran problema de presentar resistencia a múltiples antibióticos.⁵

El incremento en la frecuencia de la resistencia a los antibióticos se debe en gran medida, a una combinación de diferentes causas como son: características de las bacterias, presiones selectivas debidas al uso de antibióticos, aspectos políticos y socioeconómicos de una población, factores genéticos bacterianos y cambios demográficos.^{5,9,39} Si bien, el uso de antibióticos en los seres humanos y en animales es considerado como el principal factor en la emergencia de la resistencia a los antibióticos, se debe considerar, la presencia de otros reservorios para las bacterias resistentes y genes de resistencia, así como, factores del huésped que lo predisponen a problemas infecciosos, y, por otra parte, las dinámicas de transmisión que promueven la diseminación de las cepas resistentes en las comunidades.⁹

En el Ecuador, si bien, ha sido documentada una alta prevalencia de cepas entéricas resistentes a los antibióticos en centros urbanos, especialmente a los antibióticos de primera línea, como lo demuestra un estudio reciente de prevalencia realizado en 13 hospitales de Quito, tal como lo indica la tabla No 1 (Anexo No. 2), sin embargo, la prevalencia sobre resistencia bacteriana en áreas rurales permanece desconocida. Por otro lado, y en vista de que, la resistencia a los antimicrobianos es un gran problema que continúa incrementándose día a día en el Ecuador, al igual que en todo el mundo, comprender las dinámicas de la emergencia, mantenimiento y los factores involucrados en la diseminación de cepas resistentes a los antibióticos en comunidades es de vital importancia para intervenciones efectivas y es uno de los motivos para el desarrollo de esta tesis.

Las vías de comunicación, entre comunidades, entre ciudades, entre pueblos cercanos y lejanos, constituyen un factor muy importante en la circulación y establecimiento de bacterias resistentes en comunidades remotas.^{9,47,55} El principal objetivo de este proyecto de tesis fue estudiar la circulación de genotipos de *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos en 21 comunidades remotas de la provincia de Esmeraldas, que tienen un distinto grado de acceso al sistema vial ecuatoriano. Se propuso además, evaluar la influencia de la nueva carretera en la diseminación de cepas resistentes. Esta investigación forma parte de un importante proyecto de Ecología de Desarrollo Sociedad

y Salud (ECODESS) que lleva a cabo la Universidad de California, Berkeley, y la Universidad San Francisco de Quito, en la región Noroccidental de la provincia de Esmeraldas, en el Ecuador.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Población en estudio y datos demográficos:

El presente estudio fue realizado en el cantón Eloy Alfaro de la provincia de Esmeraldas (Ecuador). El área de estudio se encuentra localizada en la costa Noroccidental de la provincia de Esmeraldas, tiene una extensión de 3.200 km² y una población de aproximadamente 20.000 habitantes (este dato representa el 5% de la población de Esmeraldas que tiene aproximadamente 390.000 habitantes). Dos importantes grupos étnicos habitan la zona, los Afroecuatorianos (Negros) y Chachis. Aproximadamente, el 80% de la población son negros que viven en comunidades y se asientan a lo largo de tres ríos: Cayapas, Santiago y Onzole. El 20% restante corresponde a indios Chachis. Los Chachis, generalmente viven en las áreas más remotas a lo largo de estos ríos. Los dos grupos viven en áreas geográficamente segregadas. La población Chachi no fue tomada en cuenta en este estudio, debido a que ellos no hablan español. El cantón Eloy Alfaro está formado por 12 parroquias y 150 comunidades, de éstas fueron seleccionadas para el estudio 21 comunidades. Se tomaron en cuenta para esta selección tres variables: 1) Tiempo de transporte desde Borbón; 2) El costo de transporte desde Borbón, y; 3) Tamaño de la población de las comunidades. Borbón, es una población considerada como el principal centro comercial de la región y se encuentra localizada en la confluencia de los principales ríos, Cayapas y Santiago. El mapa correspondiente a la región en estudio fue creado usando una combinación de mapas topográficos existentes e información proporcionada por el Global Positioning System (GPS) (Ver Anexo No. 3). La edad

promedio de la población fue de 16.6 años. La distribución de la población por género fue de: 52% género masculino y 48% género femenino.

7.1.1 Diseño del estudio: El diseño original del estudio es de casos y controles, sin embargo, para establecer la prevalencia de resistencia a los antibióticos, se realizó un diseño de corte transversal en pacientes con o sin diarrea.

7.2 Recolección y procesamiento de las muestras

Un total de 358 muestras de heces fecales fueron recolectadas durante el lapso de un año (Julio del 2003 a Julio del 2004) en las 21 comunidades del cantón Eloy Alfaro. Los especímenes fueron colocados en contenedores limpios (bolsas plásticas) según las instrucciones recibidas por el equipo de trabajo del proyecto de Ecología y de Desarrollo Sociedad y Salud (ECODESS). Una pequeña porción de cada muestra fue tomada con hisopo e introducida en un tubo de Cary-Blair (medio de transporte), a continuación las muestras fueron trasladadas al laboratorio ubicado en la zona para ser sembradas en placas de agar MacConkey para el posterior aislamiento de las bacterias entéricas. En el laboratorio de microbiología de la Universidad San Francisco de Quito se tomaron las colonias lactosa positivas y se sembraron en agar Chromocult™ (Merck) para confirmarlas como *Escherichia coli* por la producción de MUG (4-metil-umbeliferil- β -glucorinidasa). Doscientos ochenta y ocho muestras tuvieron actividad de β -glucorinidasa, por lo tanto, fueron consideradas como *Escherichia coli*.

7.3 Análisis de resistencia a los antibióticos

Las prueba de sensibilidad a los antibióticos fue realizada a todos los aislados de *E. coli* y fue determinada por el método de difusión en disco, o técnica de Kirby-Bauer usando agar Mueller-Hinton (Becton Dickinson), de acuerdo a las especificaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2001). Los discos de antibióticos utilizados en el estudio fueron: ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, cefotaxima y ciprofloxacino. *Escherichia coli* ATCC 25922

(American Type Culture Collection) fue utilizada como cepa de control de calidad. Se midió los diámetros de los halos de inhibición de cada antibiótico y los aislados fueron reportados como sensibles, intermedios y resistentes (NCCLS, 2001).

7.4 Fingerprinting genómico de las cepas de *E. coli* por ERIC-PCR

7.4.1 Liberación del ADN:

Cada uno de los aislamientos de *E. coli* resistentes a uno o más de los antibióticos empleados en el estudio, se cultivó en placas de agar nutritivo a 37°C durante 24 horas. Se resuspendió el cultivo bacteriano en 5 ml de agua destilada estéril. Se tomó 1 ml de la suspensión bacteriana y se centrifugó por 2 minutos a 12.000 rpm. Se resuspendió el pellet (sedimento) en 100 µl de agua destilada estéril y se lo hirvió durante 10 minutos en baño María. Se centrifugó por 10 minutos y el sobrenadante fue utilizado como fuente de ADN.

7.4.2 Amplificación de ADN

El ensayo de fingerprinting (huellas digitales) por ERIC-PCR (enterobacterial-repetitive-intergenic-consensus sequences-PCR), fue realizado utilizando 2 pmol de primer ERIC2 (5'-aag-taa-gtg-act-ggg-gtg-agc-g -3'), 1µl del sobrenadante (ADN) de la muestra para un volumen final de reacción de 25 µl. Para la amplificación se utilizó Ready To Go PCR Beads™ (Amersham-Pharmacia Biothech Estados Unidos). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 minutos iniciales de denaturación a 94°C, seguido de 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C, 4 minutos a 72°C y 1 minuto de extensión final a 72°C.

7.4.3 Electroforesis y análisis de los geles

A los fragmentos de PCR se los separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y fueron teñidos con bromuro de etidio. Se usó como marcador de tamaño un ladder de 1 kb (Invitrogen). La secuencia del primer y el protocolo de amplificación fueron proporcionados por Lee W. Riley (Universidad de Berkeley). Los productos amplificados por ERIC-PCR fueron visualizados por transiluminación ultravioleta. Los perfiles electroforéticos fueron analizados con el programa Kodak 1D Image Analysis Software™, Eastman Kodak Company. Los dendrogramas obtenidos a partir de los pesos moleculares de cada banda fueron construidos con el programa estadístico NTSYSpc Versión 2.11f Copyright © 1986-2002 Applied Biostatistics Inc. La construcción de los clusters (agrupamientos) fue realizado con el método UPGMA (unweighted-pair-group method with arithmetic linkages) y los porcentajes de similitud entre los modelos fueron calculados con el coeficiente Dice de diversidad.

7.5 Análisis estadístico

Se realizaron estadísticas descriptivas tales como frecuencias y porcentajes. Con el fin de observar si existe relación directa entre las distancias de las comunidades estudiadas y el porcentaje de resistencia a los antibióticos encontrado en ellas, se realizó el análisis estadístico de correlación utilizando el programa estadístico SPSS 12.0 for windows (Tablas 6 y 7). Para tal efecto se midió las distancias en Km desde cada comunidad a Borbón (principal centro comercial de la zona en estudio) ubicado en la principal vía de comunicación del área, y a dos puntos más de la carretera, es decir, de cada comunidad a la comunidad de San Agustín (comunidad No. 3, se encuentra en la carretera) y de cada comunidad al punto más cercano de la carretera, estas dos últimas mediciones se las realizó en milímetros en el mapa de la zona en estudio (Anexo No. 3).

8. RESULTADOS

Se analizaron un total de 358 muestras de heces de los habitantes del cantón Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas (Ecuador), de las cuales se aisló enterobacterias fermentadoras de lactosa, para determinar los patrones de resistencia a antibióticos y su distribución. De estos aislamientos, 288 (80.44%) correspondieron a *Escherichia coli* (con actividad de β -glucoronidasa o chromocult positivas), 59 cepas (16.46%) no fueron *E. coli* (chromocult negativas), 10 cepas (2.8%) estaban muertas y una fue identificada como *Klebsiella oxytoca* (0.3%) (Gráfico No. 7).

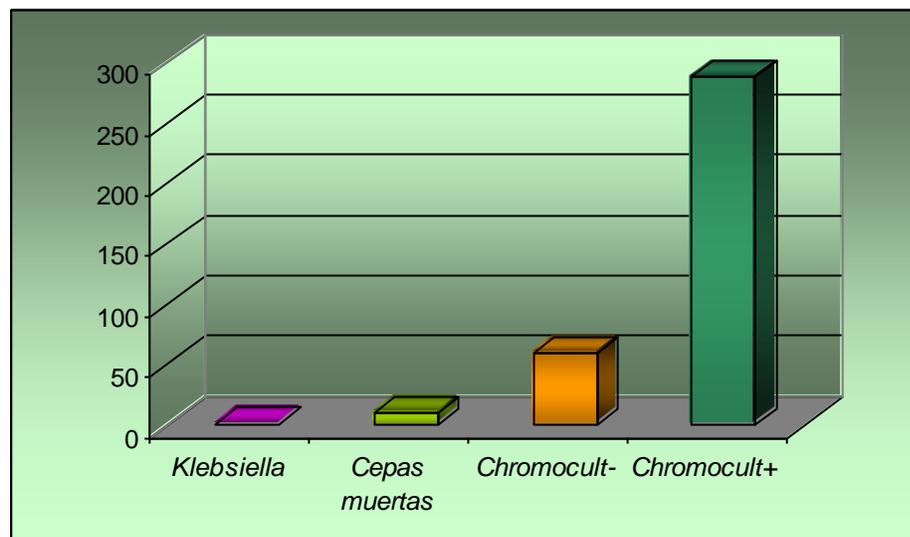


Gráfico No. 7: Análisis de 358 cultivos bacterianos aislados de muestras de heces de pobladores del cantón Eloy Alfaro, Provincia de Esmeraldas, Ecuador. El grupo de cepas chromocult positivas corresponden a *Escherichia coli* (288 cepas). A este grupo se realizaron las pruebas de sensibilidad a los antibióticos.

Se realizaron las pruebas de sensibilidad a los 288 aislados de *E. coli*, de éstos, 118 cepas (41.0%) presentaron resistencias a los diferentes antibióticos utilizados: ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloramfenicol, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacino y cefotaxima; y, las 170 (59%) cepas restantes no presentaron resistencia alguna a los

antibióticos empleados. Se debe aclarar que tres cepas resistentes (1.0%) se perdieron cuando se iba a confirmar la sensibilidad al disco de tetraciclina. (Gráfico No. 8).

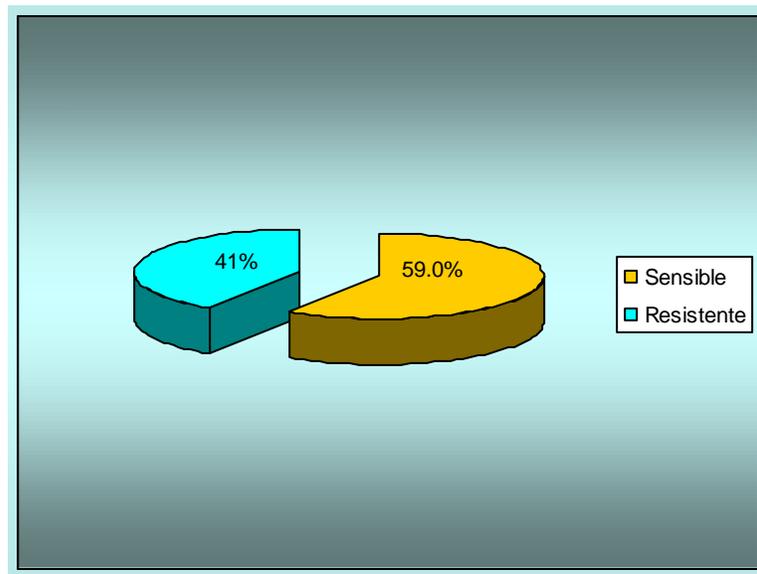


Gráfico No. 8: Porcentaje de sensibilidad y resistencia que presentan las 288 cepas de *Escherichia coli*. El 41.0% de un total de 288 cepas de *E. coli* fueron resistentes a los antibióticos utilizados en el estudio y el 59% fueron sensibles. El 41 % corresponde a 118 cepas resistentes..

Diferentes patrones de sensibilidad se establecieron después de medir los halos de sensibilidad (sensible, resistente e intermedio) de los 288 aislamientos de *E. coli*. El número de cepas sensibles y resistentes a los siguientes antibióticos - ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacino, gentamicina y cefotaxima - se encuentran detallados en la tabla No. 1. Sólo se encontraron 2 cepas con sensibilidad intermedia al ciprofloxacino. El porcentaje de resistencia a cada antibiótico fue el siguiente: tetraciclina (33.7%), ampicilina (28.1), trimetoprim-sulfametoxazol (25.3), cloranfenicol (6.6%), ciprofloxacino (1%), tal como lo muestra la tabla No. 2. En el caso del ciprofloxacino, se tomaron en cuenta tanto la cepa resistente como las dos con sensibilidad intermedia para sacar el porcentaje de resistencia. Para efecto de los siguientes cálculos sólo se tomarán en cuenta las 115 cepas que presentaron resistencia a

los 7 antibióticos usados (las 3 restantes se perdieron). En cuanto a cefotaxima y gentamicina, se observó que todas las cepas de *Escherichia coli* fueron sensibles a estos antibióticos.

Tabla No. 1: Sensibilidad y Resistencia de los 288 aislados de *Escherichia coli* a cada uno de los siete antibióticos empleados en el presente estudio.

Antibióticos	Sensible	Resistente	Intermedio	% Resistencia N=288
Ampicilina	207	81	0	28.1
Trimtoprim-sulfametoxazol	215	73	0	25.3
Cloranfenicol	269	19	0	6.6
Ciprofloxacino	285	1	2	1.0
Tetraciclina	191	97	0	33.7
Gentamicina	288	0	0	0
Cefotaxima	288	0	0	0

Los antibióticos frente a los cuales se encontró mayor número de resistencias son Ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina. N=288

En el presente estudio se establecieron diferentes grupos de resistencia, así: 39 cepas (33.9%) de las 115 presentaron resistencia a tres antibióticos: ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina; 18 cepas (15.65%) presentaron resistencia a tetraciclina, 13 cepas (11.3%) presentaron resistencia a ampicilina y tetraciclina; 11 cepas (9.56%) presentaron resistencia a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina; 10 cepas (8.7%) presentaron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y

tetraciclina, 6 cepas (5.22%) presentaron resistencia a Ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, ciprofloxacino y tetraciclina. Se puede ver claramente que el grupo que presenta mayor número de cepas resistentes es el que corresponde a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, a este le sigue en número de resistencias, el grupo que corresponde a ampicilina y tetraciclina; además, se observa un alto porcentaje de cepas que presentan resistencia a las tetraciclinas.

Tabla No. 2: Distribución de los trece fenotipos resistentes de *E. coli* encontrados en el estudio.

Grupo de antibióticos	No. cepas	% cepas resistentes
Amp,TMP-SMX, Clo, Cip,Te	2	1.74
Amp,TMP-SMX, Clo,Te	11	9.56
Amp,TMP-SMX,Te	39	33.9
Amp,TMP-SMX,Clo	2	1.74
Amp,Clo, Te	3	2.61
TMP-SMX,Te	10	8.7
Amp,TMP-SMX	4	3.48
Amp,Te	13	11.3
Amp, Clo	1	0.87
Cip,Te	1	0.87
TMP-SMX	5	4.35
Amp	6	5.22
Te	18	15.65

El grupo que presenta el mayor porcentaje de resistencia corresponde a Ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina (33.9%) seguido del grupo correspondiente a la tetraciclina (15.65%). Veinte y nueve cepas fueron resistentes a un solo antibiótico y 86 fueron resistentes a más de un antibiótico Amp: ampicilina; TMP-SMX: trimetoprim-sulfametoxazol; Clo: cloranfenicol; Te: tetraciclina; Cip: ciprofloxacino. Total de cepas resistentes en el estudio = 115

Se cuantificaron las muestras recibidas por cada comunidad, con el fin de conocer el número de muestras tomadas, el número de muestras que presentaba resistencia a los antibióticos y el porcentaje de resistencia en cada una de las comunidades del estudio. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla No. 3. La población del grupo de estudio (21 comunidades del cantón Eloy Alfaro) fue sometida a un censo para establecer

el número de individuos (residentes) y el número de casas por cada comunidad. Los datos arrojados por el censo realizado indicaron que el tamaño de la muestra era de 4,212 residentes los cuales fueron censados en 1085 casas. El número de residentes se encontraba distribuido de manera desigual en las 21 comunidades y aproximadamente el 50% de ellos formaban parte de las cuatro principales y más grandes comunidades, esto es: Colón Eloy con 19.6% del total de habitantes, Santo Domingo con 11.2%, Timbiré con 11.0% y Telemi con 6.7%. Los mayores porcentajes de resistencia se presentaron en San Agustín (67.6%), Wimbi (62.5%), Paya de Oro (58.3%) y Timbiré (53.8%) De la comunidad Tangaré, no se tomaron muestras, por lo tanto, no tenemos el dato de resistencia tal como lo demuestra la Tabla 3.

Tabla No. 3: Comparación del tamaño de las comunidades, el número de cepas resistentes a los antibióticos en cada comunidad y el porcentaje de resistencia.

Comunidad	Tamaño de la población vs %	No. Casas por comunidad vs %	Total de muestras tomadas vs %	No. de cepas Resistentes	% de cepas resistentes n=115
San Miguel (21)	122 (3)	23 (2)	13 (10.7)	7	53.8(5.7)
Trinidad (20)	98 (2)	18 (2)	3(3.1)	1	33.3(1)
Telemi (19)	281 (7)	68 (6)	39(13.9)	16	41.0(5.7)
El Rosario (18)	112 (3)	22 (2)	7(6.3)	0	0.0(0)
Sto. Domingo (17)	471 (11)	109 (10)	39(8.3)	11	28.2(2.3)
Arenales (16)	144 (3)	46 (4)	3(2.2)	0	0.0(0)
Vaquerita (14)	24 (1)	6 (1)	6(25)	1	16.7(4.2)
Las Cruces (13)	101 (2)	24 (2)	10(9.9)	3	30.0(3)
Naranjal (12)	61 (1)	17 (2)	11(18)	3	27.3(5)
Playa de Oro (11)	230 (6)	59 (5)	12(5.2)	7	58.3(3)
Guayabal (10)	128 (3)	38 (4)	2(1.6)	1	50.0(0.8)
Wimbi (9)	316 (8)	90 (8)	16(5.1)	10	62.5(3.2)
Roca Fuerte (8)	146 (4)	39 (4)	20(13.7)	4	20.0(2.7)
La Peña (7)	99 (2)	22 (2)	1(1)	0	0.0(0)
Quinto Piso (6)	63 (2)	17 (2)	3(4.8)	0	0.0(0)
Colón Eloy (5)	824 (20)	210 (19)	27(3.3)	10	37.0(1.2)

Timbiré (4)	463 (11)	137 (13)	13(2.8)	7	53.8(1.5)
San Agustín (3)	277 (7)	72 (7)	34(12.3)	23	67.6(8)
La Loma (2)	121 (3)	31 (3)	23(19)	9	39.1(7.4)
Ranchito (1)	49 (1)	9 (1)	6(12.2)	2	33.3(4.1)
Tangaré (15)	82 (2)	28 (3)	0(0)	0	0.0(0)
Total	4212	1085	288	115	

La población está distribuida en 21 comunidades y el 50% de sus residentes habitan en cuatro grandes comunidades: Colón Eloy (19.6%), Santo Domingo (11.2%), Timbiré (11.0%) y Telembi (6.7%). Los mayores porcentajes de resistencia fueron encontrados en San Agustín (67,6%), Wimbi (62.5%), Playa de Oro (58.3%) y Timbiré (53.8%). De la comunidad Tangaré, no se tomaron muestras, por lo tanto, no tenemos el dato de resistencia en esta comunidad.

Basados en los porcentajes de resistencia encontrados en cada una de las comunidades analizadas en el presente estudio, se determinó el porcentaje de resistencia que presentaba cada antibiótico frente al número total de cepas resistentes hallados en las comunidades en estudio, de manera que, los datos obtenidos se encuentran detallados en la tabla No. 4. Las comunidades en las cuales el número de muestras tomadas fue mayor, corresponden a Telembi (19), Sto Domingo (17), Colón Eloy (5) y San Agustín (3) marcadas con asterisco en la tabla. Las comunidades que presentan mayor número de resistencias son las mismas ya mencionadas y se adiciona al grupo la comunidad Wimbi (9). Los antibióticos frente a los cuales se presenta alta resistencia son ampicilina (Amp), trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) y tetraciclina (Te), en la tabla 4 se encuentran en detalle, únicamente las comunidades en las que se tomó el mayor número de muestras y en las que se encontró el mayor número de cepas resistentes, las comunidades que en las cuales hay baja resistencia y bajo número de muestras no están descritas en la Tabla 4.

Tabla No. 4: Relación entre el número de muestras tomadas en cada comunidad y el porcentaje de cada antibiótico con respecto al total de cepas resistentes.

Comunidades	n=muestras tomadas	n=Cepas resistentes	Amp	TMP-SMX	Te	Clo	Cip	Ge	Ctx
21	13	7	57.1	85.7	85.7	14.3	0	0	0
19*	39*	16*	68.8	68.8	93.8	18.8	0	0	0

17*	39*	11*	60	50	90	20	0	0	0
11	12	7	100	71.4	71.4	42.8	0	0	0
9	16	10*	77.8	77.8	100	22.2	11.1	0	0
8	20	4	50	25	25	0	0	0	0
5*	27*	10*	70	60	80	10	0	0	0
4	13	7	42.8	14.3	100	0	0	0	0
3*	34*	23*	82.6	82.6	78.3	17.4	4.3	0	0
2	9	9	60	50	80	20	0	0	0

La comunidad 3 presenta el mayor número de cepas resistentes frente al resto de comunidades descritas en la tabla. Las comunidades que presentaban bajo número de muestras y bajo número de cepas resistentes no se encuentran detalladas en la presente tabla. Las comunidades marcadas con asterisco representan a aquellas en las que se tomó mayor número de muestras.

Según el análisis estadístico de correlación, no se observa significancia ($p < 0.05$) entre las distancias obtenidas y el porcentaje de resistencia encontrado, los valores de p obtenidos son superiores a 0.05. Ver las tablas No. 5 y 6. Sin embargo, cuando se realizaron los análisis de regresión con las variables dependiente (porcentaje de resistencia) e independiente (porcentaje de muestras), se encontró que la proporción de muestras tomadas en las comunidades si presentó una relación estadísticamente significativo de 0.027 ($p < 0.05$), es decir que a mayor número de muestras tenemos mayor resistencia. Ver las tablas 5 y 7.

Tabla No. 5 Relación entre los porcentajes de muestras resistentes y las distancias de cada comunidad.

Comunidades	% muestras tomadas	% muestras resistentes	Distancias Km	Distancias a Borbón mm	Distancias a S. Agustín mm	Distancias a la Carretera mm
21	10.7	5.3	78.4	121.5	104.0	76.0

19*	6.4	5.7	60.6	100.0	82.0	61.0
17*	8.3	2.3	50.1	104.0	99.5	73.0
11	5.2	3.0	45.8	103.0	73.5	56.0
9	5.0	3.2	54.6	90.0	61.0	46.0
8	13.7	2.7	39.2	62.5	35.0	23.0
5	3.0	1.2	16.8	38.0	9.0	6.0
4	2.8	1.5	26.8	64.0	37.0	27.0
3*	12.3	8.3	12.5	29.0	0.0	0.0
2	19	7.4	7.0	15.0	38.5	15.0

No se observa correlación entre las distancias (en km y en mm) y la resistencia a los antibióticos, más bien existe correlación entre el porcentaje de muestras tomado y el porcentaje de resistencia. Los asteriscos indican que esas son las comunidades donde mayor número de muestras se tomó.

Tabla No. 6: Correlación entre los porcentajes de resistencia a los antibióticos encontrados y las distancias de las comunidades a Borbón, a San Agustín y a la carretera.

Coeficientes

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constante)	5.001	4.600		1.087	.327
	% resistencia	.475	.215	1.008	2.212	.078
	Borbón (mm)	-.128	.126	-1.891	-1.014	.357

San Agustín	-.409	.325	-5.947	-1.257	.264
Carretera (mm)	.687	.554	7.722	1.241	.270

En la tabla no se observa correlación entre el porcentaje de resistencia a los antibióticos y las distancias a Borbón, San Agustín y al punto más cercano de la carretera desde cada una de las comunidades de las comunidades señaladas, en estos casos, los valores de p son: 0.357 (Borbón), 0.264 (San Agustín) y 0.270 (Carretera). La significancia estadística se establece cuando $p < 0.05$. Los resultados de la tabla fueron calculados con el programa estadístico SPSS 12.0 for windows

Variable dependiente: % de resistencia

B: Coeficientes no estandarizados

Beta: Coeficientes estandarizados

t: distribución

Tabla No. 7: Correlación entre el porcentaje de resistencia a los antibióticos encontrados y el porcentaje de muestras.

Coeficientes

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constante)	1.238	1.199		1.032	.332
	% de resistencia	.327	.120	.692	2.714	.027

En la tabla, se establece correlación entre el porcentaje de resistencia a los antibióticos y el porcentaje de muestras tomadas, $p = 0.027$. La significancia estadística se establece cuando $p < 0.05$. Los resultados de la tabla fueron calculados con el programa estadístico SPSS 12.0 for windows.

Variable dependiente: % de resistencia

B: coeficientes no estandarizados

Beta: Coeficientes estandarizados

t: distribución

El análisis de tipificación molecular realizado por ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus – PCR) fue llevado a cabo en los 115 aislados de *E. coli*. Los resultados de ERIC-PCR fueron obtenidos a partir de los 13 patrones de resistencia establecidos en los tests de sensibilidad a los antibióticos (Kirby-Bauer). Los patrones electroforéticos (fingerprintings) obtenidos de las muestras de ADN de las cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina, principal grupo de resistencia (33.9%) en el estudio, mostraron diferentes número de bandas con diferentes pesos moleculares. Se establecieron dos grupos dentro de este fenotipo. El dendrograma obtenido a partir del modelo de ERIC-PCR correspondiente al fenotipo resistente a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina (grupo1), deja visualizar claramente 3 clusters (agrupamientos): el cluster A incluye dos cepas clonales en los aislados de las comunidades 21 y 4; el cluster B tiene dos cepas clonales en los aislados de las comunidades 11 y 5; y en el C no se encuentran grupos clonales. El porcentaje de similitud entre los clusters es de 74%. En el segundo grupo del mismo fenotipo se observan tres clusters; tanto el B como el C presentan cepas clonales en las comunidades 17, 2 y 19. En el cluster A no se identifican clones. El porcentaje de similitud entre estos clusters es de aproximadamente el 89%. Los patrones electroforéticos de las cepas resistentes a la tetraciclina dan como resultado un dendrograma que muestra la presencia de dos principales clusters, en el A se encuentran dos cepas clonales en las comunidades 3 y 9, mientras tanto, en el cluster B no se encuentra ningún grupo clonal. El porcentaje de similitud entre clusters es del 62%. Los patrones obtenidos del fenotipo resistente a ampicilina y tetraciclina produjeron un dendrograma en el cual se visualiza la presencia de un cluster importante, el A, en este se

observan cepas clonales en las comunidades 3 y 9; en el B no se encuentran clones. El porcentaje de similitud en este grupo es del 81 %. En cuanto a los patrones establecidos en el grupo que presenta resistencia a la tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, también se encuentran dos clusters, en el A se observan cepas clonales en las comunidades 21 y 9, entretanto, en el cluster B no se observa ningún grupo clonal. El porcentaje de similitud en este caso es de aproximadamente el 54 %. Los patrones electroforéticos establecidos a partir de los aislados resistentes a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol, muestran dos clusters, en el A se puede ver la presencia dos cepas clonales aisladas en la misma comunidad, es decir, en la comunidad 11, mientras que en el cluster B no se visualizan grupos clonales. El porcentaje de similitud en este grupo de cepas resistentes es del 54%. Los patrones electroforéticos correspondientes al grupo resistente a la ampicilina produjeron un dendrograma en el que se observan dos clusters, el A, presenta cepas clonales aisladas de las comunidades 11 y 14 y de las comunidades 11 y 10; en el cluster B no visualizan cepas clonales; y el porcentaje de similitud en este grupo es del 27%. En el caso de la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol, el mismo clon se observa en 4 de las 5 comunidades donde se encuentra este fenotipo de resistencia, estos 4 clones están agrupados en el cluster A. El porcentaje de similitud entre los dos grupos es del 11%, sin embargo, las cuatro cepas clonales (cluster A) es del 100% El dendrograma producido a partir del fenotipo resistente a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol establece dos clusters, en el A, se pueden observar cepas clonales en las comunidades 3 y 17. El porcentaje de similitud de los dos clusters es del 20 % El dendrograma relacionado con los aislados que presentan resistencia a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, tiene dos clusters, el B presenta dos clones en las comunidades 17 y 2, el cluster A no presenta ningún grupo clonal. En este caso no se observa similitud entre los dos clusters (0%). El dendrograma que representa al fenotipo resistente ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina y ciprofloxacino presenta dos grupos clonales aislados en las comunidades 9 y 3. En este grupo, cabe resaltar, solo se tomaron dos muestras y las dos cepas aisladas fueron clonales (Ver Anexo No. 4: Dendrogramas y Anexo No. 5: Electroforesis).

9. DISCUSIÓN

Estudios de prevalencia de resistencia a los antibióticos han demostrado que la resistencia puede estar relacionada, con cambios demográficos.⁶⁷ El tamaño de las poblaciones, las migraciones poblacionales, los viajes y el contacto entre individuos que habitan en comunidades aisladas con aquellos de las grandes urbes o con aquellos que estuvieron hospitalizados, ha promovido el auge de cepas resistentes^{34,64}. En el presente estudio, llevado a cabo en el cantón Eloy Alfaro, localizado en la provincia de Esmeraldas, Ecuador, población relativamente aislada de las áreas urbanas; las 21 comunidades analizadas tienen poco grado de conectividad vial entre sí, sin embargo, la construcción de la principal vía de acceso en la zona, parece haber influido de alguna manera en el aumento de resistencia a los antibióticos, tal como lo demuestran los datos obtenidos en este trabajo. En el estudio se emplearon cepas de *Escherichia coli*, (importante comensal del tracto gastrointestinal) obtenidas de materia fecal de personas sanas y enfermas (con diarrea). Es importante destacar, que éste es el primer estudio de resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* realizado en comunidades remotas del Ecuador. Por este hecho, no hay datos de otros estudios en condiciones similares con los que se pueda realizar un análisis comparativo de esta problemática.

Con el fin de determinar la sensibilidad a los antibióticos, se utilizó la técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer). Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran una alta prevalencia (41%) de cepas de *Escherichia coli* resistente a los antibióticos (ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacino, gentamicina y cefotaxima) en las 21 comunidades del cantón Eloy-Alfaro. Un alto nivel de resistencia fue encontrado con respecto a la tetraciclina (37.7%), nivel que tiene similitud con lo que se describe en otros estudios de resistencia (Marilyn Roberts, 2005), pues aunque el uso de tetraciclinas ha disminuido considerablemente en la actualidad, la fuerte presión selectiva ejercida por el gran consumo de esta droga desde su apareamiento, incrementó de manera alarmante los niveles de resistencia, de manera que, aún hoy, después de que la presión selectiva se ha reducido, se mantienen altas tasas de resistencia a la tetraciclina

debido a la estabilización de múltiples genes de resistencia y a la diseminación de múltiples clones de resistencia en las poblaciones bacterianas.⁷³ Sin embargo, es importante señalar, que si bien el uso de esta droga en humanos ha disminuido, el uso en veterinaria como promotor de crecimiento y en terapéutica todavía es muy alto. Se debe también resaltar, que un factor que incide en el amplio uso de tetraciclinas en la actualidad, es su bajo costo. Los niveles de resistencia a la ampicilina (28.1%) y al trimetoprim-sulfametoxazol (25.3%) entre las cepas de *E. coli* también fueron altos, en comparación con el resto de antibióticos empleados. Cabe mencionar que, la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol, muy común en comunidades, está frecuentemente asociada con la resistencia a múltiples antibióticos, entre los cuales tenemos a ampicilinas, aminoglucósidos, cefalosporinas, cloranfenicol y tetraciclinas,^{16,31} y generalmente, se asocia a la presencia de elementos móviles llamados integrones, los cuales se distribuyen ampliamente en enterobacterias y en bacterias pseudomonales.^{18,47} Este mecanismo de resistencia le permite a la bacteria capturar cassettes de resistencia adicionales, en un orden determinado y no al azar.³¹ Con respecto a la quinolona (ciprofloxacino), aunque sólo alcanzó un bajísimo nivel de resistencia (1%) en el estudio, es importante indicar que la resistencia cromosomal a este grupo de agentes antibacterianos es fácilmente transferible,⁵⁸ por lo que, la experiencia en otros países demuestra que la resistencia se ha incrementado notablemente debido a la presión selectiva ejercida por el exagerado uso de estos antibióticos.⁵⁸ La resistencia a las quinolonas en el Ecuador tal como lo demuestra el Anexo No 2 ha aumentado de manera considerable en los últimos años. En todo caso, tanto cefotaxima (0%) como gentamicina (0%) y cefotaxima (0%) parecen ser los antimicrobianos más activos contra *E. coli*. Se establecieron además en este estudio, grupos de resistencia con diferentes combinaciones de antibióticos (varios fenotipos de resistencia), y el grupo frente al cual se presentó la mayor prevalencia de resistencia fue el que corresponde a la ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina (33.9%), lo cual no hace más que corroborar, lo que se mencionó anteriormente en cuanto a la resistencia de estos tres antibióticos.

Numerosos métodos de tipificación molecular han sido desarrollados en la actualidad, estos procedimientos son de gran importancia en la investigación del origen de las cepas,

relación clonal y epidemiología. Aunque PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) es la técnica considerada como Gold Standard en el campo de la tipificación molecular por su alto poder discriminatorio y por su alta reproducibilidad, la utilidad de ERIC-PCR ha sido demostrada ampliamente en la detección epidemiológica de cepas de *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos, además, constituye una técnica fácil y de bajo costo en relación con PFGE. En el presente trabajo, empleamos el método ERIC-PCR, con el fin de investigar variabilidad genética y evaluar relación clonal en las cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos, sin embargo, hay que tomar en cuenta, que la electroforesis de campo pulsado constituye el método de elección para la tipificación molecular de cepas de *E. coli*. Se produjeron varios modelos de fingerprintings, de acuerdo a los patrones de resistencia previamente establecidos por los tests de sensibilidad realizados a los aislados de *E. coli*. A partir de los perfiles electroforéticos, se construyeron dendrogramas mediante el uso del sistema UPGMA (Unweighted-pair-group method with arithmetic linkages), y los porcentajes de similitud entre los modelos fueron calculados con el uso del coeficiente Dice de diversidad. Los resultados obtenidos de este análisis indican que la diseminación de cepas resistentes a los antibióticos en estas comunidades es de origen clonal. Si bien es cierto, en los patrones electroforéticos se observa variabilidad en el número de bandas que tiene cada muestra, los dendrogramas dejan visualizar con claridad la presencia de grupos clonales en los trece fenotipos de resistencia obtenidos en este estudio. Es importante señalar que, en el caso de los aislados resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, se observa el mismo clon distribuido en cuatro de las cinco comunidades en donde se encontró este fenotipo de resistencia. Con respecto, al dendrograma correspondiente al grupo de cepas resistentes a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol, se pudo visualizar en el cluster A la presencia de dos cepas clonales dentro de la misma comunidad (11), es decir, con este resultado se estaría validando la metodología empleada en este trabajo. Por otro lado, es preciso destacar además, que las cepas clonales más frecuentes en el presente estudio, constituyen aquellas aisladas en las comunidades 3 y 9, por lo que se podría deducir, que existiría una estrecha relación entre estas dos comunidades, debido posiblemente a un mayor número de acercamientos interpersonales.

Los hallazgos de este estudio, sugieren que al parecer la alta prevalencia de cepas de *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos estaría probablemente influenciada por la presencia de la nueva carretera en la zona, pues se observó que la comunidad 3, que se encuentra atravesada por esta vía, constituye el principal reservorio de cepas resistentes a los antibióticos, ya que en esta población, se encuentran distribuidos los trece fenotipos de resistencia reportados en este trabajo. Además esta comunidad tiene una conexión cercana a Borbón, población considerada como el principal centro de la región, y es el lugar donde se encuentra el hospital de referencia de la zona de estudio. Al parecer la comunidad 3 es un centro importante de llegada y salida de individuos que migran desde y hacia el resto de comunidades (20 comunidades), básicamente, a través vías de comunicaciones fluviales. Cabe mencionar, que las migraciones poblacionales en el área de estudio son constantes, de manera que, en la comunidad 3 se podrían producir encuentros continuos de individuos que viajan de una comunidad a otra, y posiblemente, estos serían los causantes de la diseminación de cepas resistentes en las 21 comunidades del cantón Eloy Alfaro. Por otro lado, se evaluó estadísticamente la correlación entre las distancias de cada una de las comunidades a la nueva y principal vía de acceso, y no se encontró correlación alguna, es decir, aparentemente, en este estudio, la distancia parecería no ser el factor de riesgo que promueva la diseminación de cepas resistentes a los antibióticos, tal como se describe en otros estudios. En resumen, la distribución de resistencia a los diferentes antibióticos empleados en el estudio, coincide con lo que se esperaba y con lo que se reporta en otros estudios similares,⁶⁷ es decir, se encontraron altas frecuencias de resistencia a los antibióticos más antiguos: tetraciclina, ampicilina y trimetoprim-sulfa y bajas frecuencia a los nuevos, lo que indicaría, que estas comunidades podrían tener mayor acceso a las drogas viejas que a las nuevas, las cuales son empleadas con mayor frecuencia en zonas urbanas. Por otra parte, el amplio uso de los antibióticos en animales es un factor de gran relevancia en la diseminación de cepas resistentes. En todo caso, los resultados de este estudio son consistentes con aquéllos que demuestran la problemática de la resistencia a los antibióticos frente a la presión selectiva ejercida por su exagerado uso. Por otro lado, los resultados obtenidos también soportan la hipótesis de que no sólo el uso de antibióticos influye en el incremento de la

resistencia, sino también, los cambios demográficos y los bajos costos de los antimicrobianos.

En cuanto a limitaciones de este estudio, se debe hacer mención al cálculo del tamaño de la muestra, el cual no fue realizado de acuerdo a los parámetros estadísticos establecidos, pues en algunas comunidades se tomaron muestras de casi toda la población, mientras que en otras casi no se tomaron muestras; la comunidad 15 por ejemplo, no aporta datos en cuanto a resistencia, puesto que, no hubo muestras que puedan representar a esta comunidad. Por otro lado, se hizo un muestreo de carácter **no** probabilístico debido a que la intención de esta investigación fue tener un conocimiento inicial o preliminar de lo que sucedía en una población remota de la provincia de Esmeraldas, Ecuador; con respecto a la gran problemática que implica la resistencia bacteriana frente a los antibióticos. El hecho de que sea una muestra **no** probabilística, podría introducir sesgo en el estudio y limitaría su validez interna, ya que lo encontrado podría no ser representativo de toda la región. Otro factor que podría limitar los resultados, es la reproducibilidad entre laboratorios de la técnica molecular (ERIC-PCR) empleada. Durante el desarrollo de este trabajo se presentaron algunos problemas con los controles positivos y negativos utilizados, al parecer se produjo algún tipo de contaminación de las muestras durante la realización de la PCR. En general, estas técnicas pueden presentar problemas metodológicos relacionados con la PCR y de contaminación de las muestras durante el proceso de preamplificación. Para evitar problemas con las técnicas moleculares, se sugiere previamente al análisis, realizar una validación en el laboratorio de los métodos que se van a emplear, de esta manera, se estarían evitando problemas con respecto a la reproducibilidad de las técnicas. En algunos casos, es aconsejable tener un software para el análisis de los patrones electroforéticos de ADN, pues éstos suelen ser difíciles de interpretar visualmente. Los criterios utilizados para interpretar los patrones de bandas en este estudio, excluyeron a aquella que eran demasiado tenues. Cabe indicar, que la lectura visual de las bandas también puede producir sesgos en la reproducibilidad de las técnicas. En todo caso, se recomienda utilizar la técnica de PFGE, para confirmar los patrones electroforéticos (fingerpringtings) obtenidos mediante ERIC-PCR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aubry –Damon H., Grenet K., Shall-Ndiaye P., Che D., Cordeiro E., Bougnoux M., Rigaud E., Le Strat Y., Lemaissier V., Armand-Lefèvre., Delzescaux D., Desencios J.C., Liènard M., Andremont A. (2004) Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerg. Inf. Dis.* **10**: 873-879
2. Austin D.J., Kristinsson K.G., Anderson R.M. (1999) The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 1152-1156
3. Babák V., Schlegelová J., Vlková H. (2005) Interpretation of the results of antimicrobial susceptibility analysis of *Escherichia coli* isolates from bovine milk, meat and associated foodstuffs. *Food Microbiol.* **22**: 353-358
4. Berge B., Adaska J. Sicho William. (2004) Use of antibiotic susceptibility patterns and Pulsed-Field Gel Electrophoresis to compare historic and contemporary isolates of multi-drug-resistant *Salmonella enteria subsp. Enterica Seroovar Newport*. *Applied and Enviromental Microbiology.* **70**: 318-323
5. Billeter Marianne. Bacterial resistance Pharmacotherapy Self-Assessment Programe, 4th Edition. <http://www.accp.com/p4b4m2sample.pdf>
6. Bradford P.A. (2001) Extended-spectrum- β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 933-951

7. Calva J.J., Sifuentes Osornio J., Cerón C.(1996) Antimicrobial Resistente in fecal flora: Longitudinal Community-Based Surveillance of children from Urban Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **40**: 1699-1702.
8. Cantón R., Coque T.M., Baquero F. (2003) Multi-resistance Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr. Opin. Infect. Dis*. **16**: 315-325
9. Carey B. and Cryan B. (2003) Antibiotic misuse in the community: a contributor to resistance? *Ir. Med.J*. **96**: 43-46
10. Chang S.S.W., Ng K.C., Lyon D.J., Cheung W.L., Cheng A.F.B., Rainer T.H. (2003) Acute bacteria gastroenteritis: a study of adult patients with positive stool cultures treated in the emergency department. *Emerg. Med. J*. **20**: 335-338
11. Čižman M. (2003) The use and resistance to antibiotics in the community. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **21**: 297-307
12. Collignon P. (2002) Antibiotic resistance. *MJA*. **177**: 325-329
13. Dionisio F., Matic I., Radman M., Rodrigues O., Taddei F. (2002) Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. *Genetics*. **162**: 1525-1532.
14. Dubnau D. (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*. **53** : 217-244
15. FDA Briefing Document prepared by Office of Drug Evaluation IV, Division of Anti- Infective Drugs Products, Division of Special Pathogen and immunologic Drug Products from Center for Drug Evaluation and Research. (2002) Developing Drugs for Resistance Pathogens. Anti-Infective Drugs Advisory Committee. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3837b2_01_Resistance.pdf
16. Fornasini M., Reves R.R., Murria B.E., Morrow A.L., Pickering M.K. (1992) Thrimetoprim resistance Escherichia coli in household of children attending day-care centers. *J. Infect .Dis*. **166**: 326-330
17. Fluit A.C. Visser M.R., Schmitz F.J. (2001) Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin. Microl.Rev*. **14**: 836-871.
18. Gold H.S., Moellering R.C. (1996) Antimicrobial-drug resistance. Review. *The New Eng. J. of Med*. **35**: 1445-1453
19. Gomi H., Jiang Z., Adachi J.A., Ashley D., Lowe B., Verenkar M.P., Stephen R., Dupont H.L. (2001) In vitro antimicrobial susceptibility testing of bacterial enteropathogens causing traveler's diarrhea in four geographic regions. *Antimicrob. Agents Chemother*. **45**: 212-216

20. González G., Mella Sergio., Zemelman R., Bello H., Domínguez M. (2004) Integrones y cassettes génicos de resistencia: Estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev. Med. Chile.* **132**: 619-626
21. Hak Sun Yu, Je Chul Lee, Hee Young Kang, Dong Woo Ro, Jae Yung Chung, Young Sook Jeong, Seon Ho Tae, Chul Hi Choi, Eun Young Lee, Sung Yong Seol, Yoo Chul Lee, Dong Taek Cho. (2003) Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5429-5433
22. Hawkey P.M. (1998) The origins and molecular basis of antibiotics resistance. *BMJ.* **317**: 657-66
23. Iwai T., Kabu H., Hondura R., Nakamura S., Ochiai H., Sasaki T., OACI Y. (2002) Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in Transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. *The American Phytopathological Society.* **15**: 515-521
24. Jain D., Sinha S., Prasad K.N., Pandey C.M. (2005) *Campylobacter* species and drug resistance in a North Indian rural community. *Transactions Royal Trop. Med. Hygiene.* **99**: 207-214
25. Johnson A. P. (2003) Antimicrobial Management—mechanisms of acquired resistance. *Hospital Pharmacist.* **10**: 380-390
26. Judson N., Mekalanos J. (2000) Transposon-based approaches to identify essential bacterial genes. *Trend in Microbiology.* **8**: 521-526
27. Khachatourans G.G. (1998) Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can. Med. Assoc.* **159**: 1129-1136
28. Kiang K.M., Kieke B.A., Como-Sabetti K., Lynfield R., Besser R.E., Belongia E.A. (2005) Clinician knowledge and beliefs after statewide program to promote appropriate antimicrobial drugs use. *Emerg. Inf. Dis.* **11**: 904-911
29. Larson M., Kronvall G., Nguyen T., Karisson I., Lager F., Hoan D., Göran T., Falkenberg T. (2000) Antibiotic medication and bacterial resistance antibiotic: a survey of children in a Vietnamese community. *Trop. Med. and Intern. Health.* **15**: 711-721
30. Leavis H.L., Willems R.J.L., Top J., Spalburg E., Mascini E.M., Fluit A.C., Hoepelman A., De Neeling A.J., Bonen M.J.M. (2003) Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg. Inf. Dis.* **9**: 1108-1115
31. Leverstein-van Hall M.A., Blok H.E.M., Donders R.T.A., Paauw A., Fluit A.C., Verhoef J. (2003) Multidrug resistance among enterobacteriaceae is strongly

- associated with the presence of integrons and is independent of species or isolated origin. *J. Infec. Dis.* **187**: 251-259
32. Levy S.B., Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. Review. *Nature Medicine Supplement.* **10**: 122-129
 33. Linares-Rodríguez J.F., Martínez-Menéndez J.L. (2005) Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enferm. Inf. Microbiol.* **23**: 86-93
 34. Lipsitch M. (2001) The rise and fall of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiol.* **9**: 438-444
 35. Manges A.R., Johnson J., Foxman B., O'bryan T.T., Fullerton K.E., Riley L.W. (2001) Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N. Engl. J. Med.* **345**: 1007-1013
 36. Martínez J.L., Baquero F. (2002) Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 647-679
 37. Mazel Didier. (2004) Integrons and the origin of antibiotic resistance gene cassettes. *ASM. News.* **70**: 5520-525
 38. Meacham K., Zhang L., Foxman B., Bauer R., Marrs C.F. (2003) Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolated by enterobacteria repetitive intergenic consensus-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5224-5226
 39. Mirelis B., Navarro F., Miró E., Mesa E., Coll P., Prats G. (2003) Community transmission of extended-spectrum β -lactamase. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 1024-1025
 40. Moreira D. (2000) Multiple independent horizontal transfers of international genes from bacteria to plasmids and phages: implications for the origin of bacterial replication Machinery. *Molec. Microbiol.* **35**: 1-5
 41. Murray B.E. (1994) Can antibiotics resistance be controlled? *The New Eng. J. of Med.* **330**: 1229-1230
 42. Naimi T. S., Ledell K.H., Bosrud D.J., Groom A.V. Steward C.E., Johnson S.K., Bessre J.M., O Boyle C., Danila R. N., Cheek J.E., Osterholm M.T., Moore K.A., Smith K.E. (2001) Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clin. Infec. Dis.* **33**: 990-996
 43. Nataro J.P., Kaper J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.Rev.* **11**: 142-201

44. Nathan C. (2004) Antibiotics at the crossroads. Are we making the right choices to bring new drugs to the marketplace? Nature Publishing Group. **431**: 899-902
45. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2001) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard-Seventh Edition M2-A7. Wayne, PA 2000
46. News Feature. (2004) A shot in the arm. Nature Publishing Group. **431**: 892-893. <http://www.nature.com>
47. O'Brien T.F. (2002) Emergency, Spread, and Environmental effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else. Clin. Infect. Dis. **34**: S78-84
48. O'Connor S., Rifkin D., Yang Y.H., Wang J.F., Levine O.S., Dowel S.F. (2001) Physicians control of pediatric antimicrobial use in Beijing, China, and its rural environs. Pediatr. Infect. Dis. J. **20**: 679-684
49. Orenca M.C., Yoon J., Ness J.E., Stemmer W.P.C., Steven. (2001) Predicting the emergency of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. Nature Structural Biology. **8**: 238-242
50. Österblad M., Kilpi E., Hakanen A., Palmu L., Huovinen P. 1999. Antimicrobial resistance levels of enterobacteria isolates from minced meat. J. Antimicrob. Chemother. **44**: 298-299
51. Österblad M., Hakanen A., Manninen R., Leistevuo T., Peltonen R., Meurman O., Huovinen P., Kotilainen P. (2000) A between-species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria in fecal flora. Antimicrob. Agents. Chemother. **44**: 1479-1484
52. Pettigrew M.M., Foxman B., Ecevit Z., Marrs C.F., Gilsdorf J. (2002) Use of Pulse-Field Gel Electrophoresis, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Typing and Automated Ribotyping to Assess Genomic Variability Among Strains of Nontypeable *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. **40**: 660-662
53. Prado V., Pidal P., Arellano C., Lagos R., San Martín O., Levine M.M. (1998) Antimicrobial multiresistance of *Shigella sp.* strains in a semi rural community of northern Santiago. Rev. Med. Chil. **126**: 1464-1471
54. Roe. M.T., Vega E., Pillai S.D. (2003) Antimicrobial resistant markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. Emerg. Inf.Dis. **9**: 822-826
55. Rowe-Magnus D.A., Guerout A.M., Mazel D. (2002) Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. Mol. Microbiol. **43**: 1657-1669

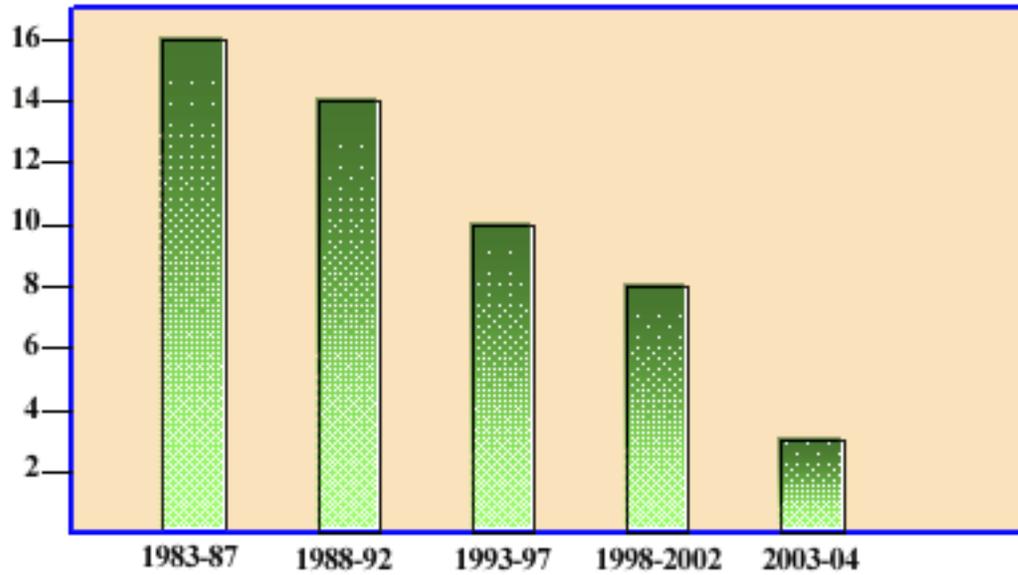
56. Samore M.H., Magill M.K., Alder S.C., Severinal E., Morrison-de-Boer L., Lyon L., Carroll K., Bishop Stone M., Bradford D., Reading J., Tomasz A., Sande M.A. (2001) High rates of multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* from healthy children living in isolated rural communities: association with cephalosporin use and intrafamilial transmission. *Pediatrics* **108**: 856-864
57. Schlager T.A., Hendley J.O., Bell A.L., Whittam T.S. (2002) Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect. And Immunity*. **70**: 1225-1229
58. Shapiro R., Lata K., Philips-Howard P., Well J.G., Adcock P., Brooks J., Ackers M., Ochieng J.B., Mintz S., Waiyaki P., Wahlquist P., Slutsker L. (2001) Antimicrobial-resistant bacterial diarrhea in rural Western Kenya. *J. of Inf.Dis.* **183**: 1701-1704
59. Smalia K., Borin S., Heuer H., Gebhard F., Van Elsas J.D., Nielsen K. (2000) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria – Are new data to fuel the debate. *Proceedings of the 6th International Symposium on The Biosafety of Genetically Modified Microorganisms*. p.146-154
60. Smith T.L., Pearson M.L., Wilcox K.R., Cruz C., Lancaster M.V., Robinson-Dunn B., Tenover F.C., Zervos M.J., Band J.D., White E., Jarvis W.R. (1999) Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N. Eng. J. Med.* **340**: 493-501
61. Swiss National Centre for Mycobacteria (SNCM), Department of Medical Microbiology, University of Zurich. (2000) *Schweiz Med Wochenschr.* **130**: 1909-1913
62. Thien-Fah M., Pitts B., Pellock B., Walker G.C., Steward P.S., O'toole G.A. (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa biofilm* antibiotic resistance. *Nature*. **426**: 306-310
63. Urban C., Segal-Maurer S., Rahal J.J. Antibiotic Resistance in a Single Hospital: Inevitable or Available? Although antibiotic use to treat specific infections can select for other multiresistant bacteria, effective control measures can reverse such trends. <http://DOCUME~1/registro/LOCALS~1/temp/feature1.asp>
64. Van den Bogaard A.E., Willems R., London N., Top J., Stobberingh E.E. (2002) Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemotherp.* **49**: 497-505
65. Wagner P.L., Waldor M.K. (2002) Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect. Immun.* **70**: 3985-3993

66. Walsh Christopher. (2000) Molecular mechanism that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. **406**: 775-781
67. Walson J.L., Marshall B., Pokrel B.M. (2001) Carriage of Antibiotic-Resistant Fecal Bacteria in Nepal Reflects Proximity to Kathmandu. *J. Infec. Dis.* **184**: 1163-1169
68. Weiner M., Dacko J., Osek J. (2004) Insertion element IS 3 PCR-based method for molecular analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Bull Vet Inst. Pulawy*. **48**: 241-246
69. Weneger H.C., Aasrestrup F.M., Jensen L.B., Hammaerum A.M., Bager F. (1999) Use of antimicrobial growth promoter in food animals and Enterococcus faecium resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg. Inf. Dis.* **5**: 329-334
70. Wilkinson D.M. (1999) Bacterial ecology, antibiotics and selection for virulence. *Ecol. Lett.* **2**: 207-209
71. Witte W. (2004) International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogen. *Rev. Infec. Gen. Evol.* **4**: 187-191
72. Wright G. (2003) Mechanisms of resistance to antibiotic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**: 563-569

ANEXOS

ANEXO No 1

Gráfico No. 1: Disminución en el número de nuevos agentes antimicrobianos.



Se puede apreciar en la gráfica que durante los años 2003-2004 la cantidad de nuevos antimicrobianos en el mercado ha disminuido considerablemente. (Ref: Carl Nathan. Nature Publishing Group. 2004)

ANEXO No 2

Tabla No. 7: Porcentaje de resistencia en enterobacterias encontrada en 13 hospitales de Quito en el año 2001. (PAHO 2002)

Bacterias	Ampicilina	Cefotaxima	Ciprofloxacino	Choramfenicol	Gentamicina	Trimetoprim sulfametoxazol	Nitrofurantoina	Cefoperazona	Ceftazidima	Amikacina
<i>Shigella flexneri</i>	88	0	0	72	0	78	nr	nr	nr	nr
<i>Shigella sonnei</i>	85	0	0	64	0	92	nr	nr	nr	nr
<i>Escherichia coli</i>	70	3	33	nr	nr	54	nr	53	11	nr
<i>Enterobacter cloacae</i>	nr	29	34	nr	53	37	nr	nr	45	22
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	nr	nr	13	nr	40	38	nr	58	nr	33

La resistencia a los antibióticos entre patógenos entéricos aislados de varios hospitales de Quito, mostró una alta prevalencia de resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y otros antibióticos

nr = Datos no reportados

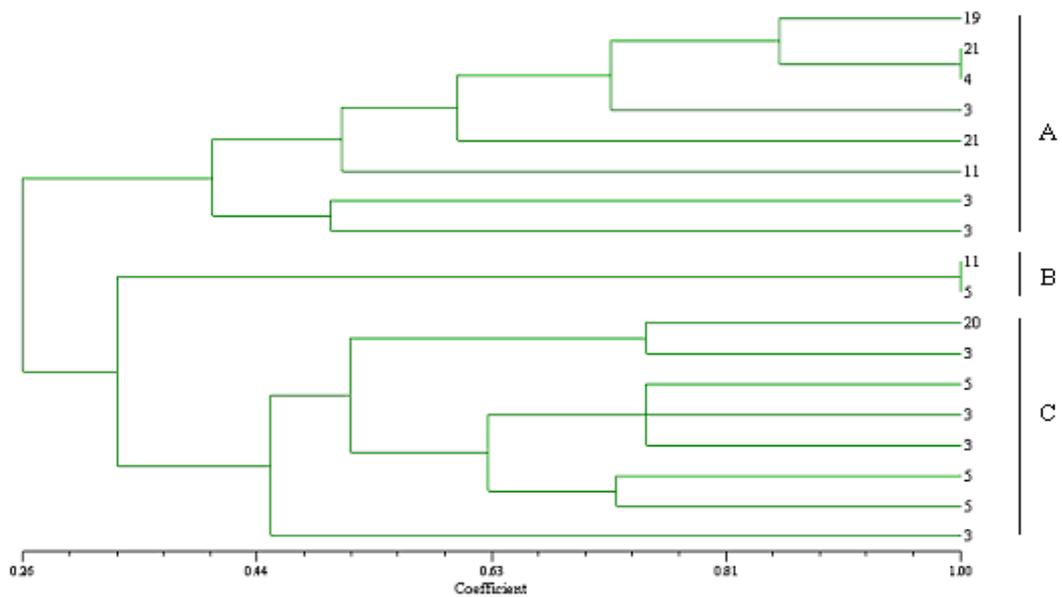
ANEXO No. 4
DENDROGRAMAS

**DENDROGRAMA: RESISTENCIA A AMPICILINA, TRIMETOPRIM-
SULFAMETOXAZOL, TETRACICLINA
GRUPO 1**



COMUNIDADES

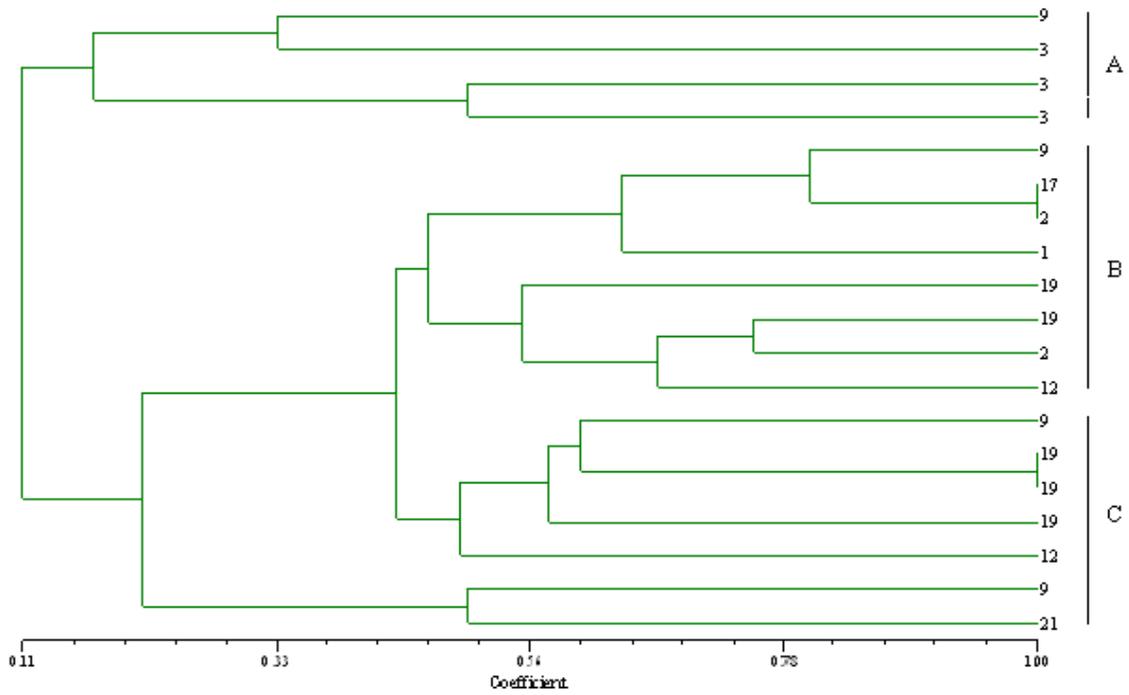
1. Ranchito
2. La Loma
3. San Agustín
4. Timbiré
5. Colón Eloy
6. Quinto Piso
7. La Peña
8. Roca fuerte
9. Wimbi
10. Guayabal
11. Playa de Oro
12. Naranjal
13. Las Cruces
14. Vaquerita
15. Tangaré
16. Arenales
17. Sto. Domingo
18. El Rosario
19. Telembi
20. Trinidad
21. San Miguel



**DENDROGRAMA: RESISTENCIA A AMPICILINA, TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL, TETRACICLINA
GRUPO 2**



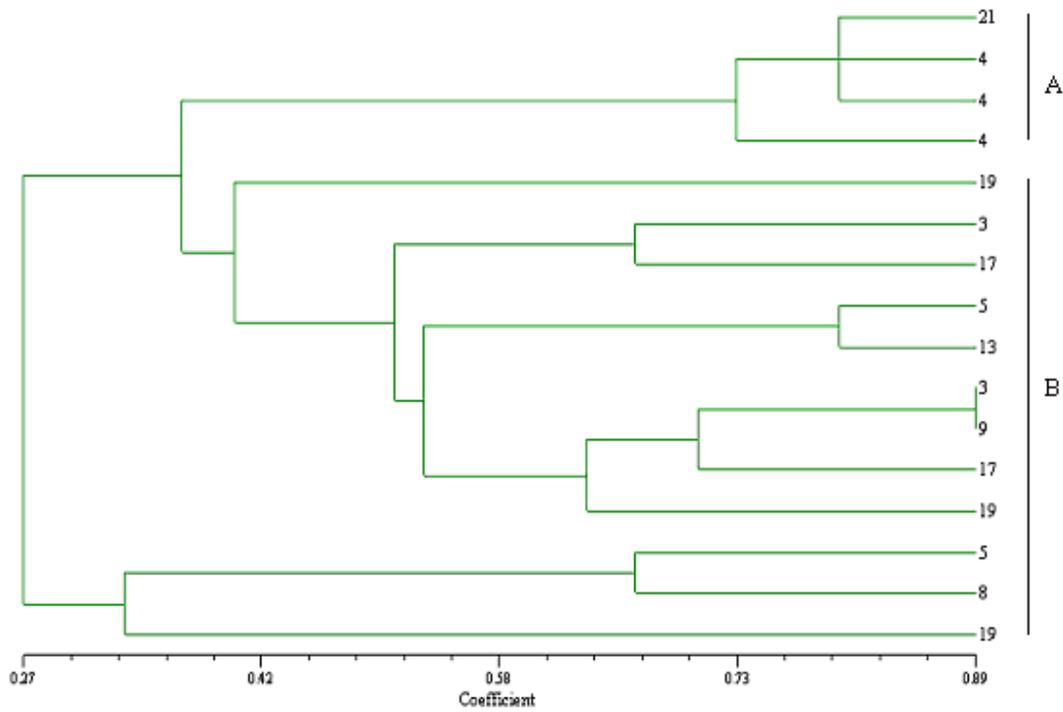
- COMUNIDADES**
1. Ranchito
 2. La Loma
 3. San Agustín
 4. Timbiré
 5. Colón Eloy
 6. Quinto Piso
 7. La Peña
 8. Roca fuerte
 9. Wimbi
 10. Guayabal
 11. Playa de Oro
 12. Naranjal
 13. Las Cruces
 14. Vaquerita
 15. Tangaré
 16. Arenales
 17. Sto. Domingo
 18. El Rosario
 19. Telembi
 20. Trinidad
 21. San Miguel



DENDROGRAMA: RESISTENCIA A TETRACICLINA



- COMUNIDADES**
1. Ranchito
 2. La Loma
 3. San Agustín
 4. Timbiré
 5. Colón Eloy
 6. Quinto Piso
 7. La Peña
 8. Roca fuerte
 9. Wimbi
 10. Guayabal
 11. Playa de Oro
 12. Naranjal
 13. Las Cruces
 14. Vaquerita
 15. Tangaré
 16. Arenales
 17. Sto. Domingo
 18. El Rosario
 19. Telembi
 20. Trinidad
 21. San Miguel

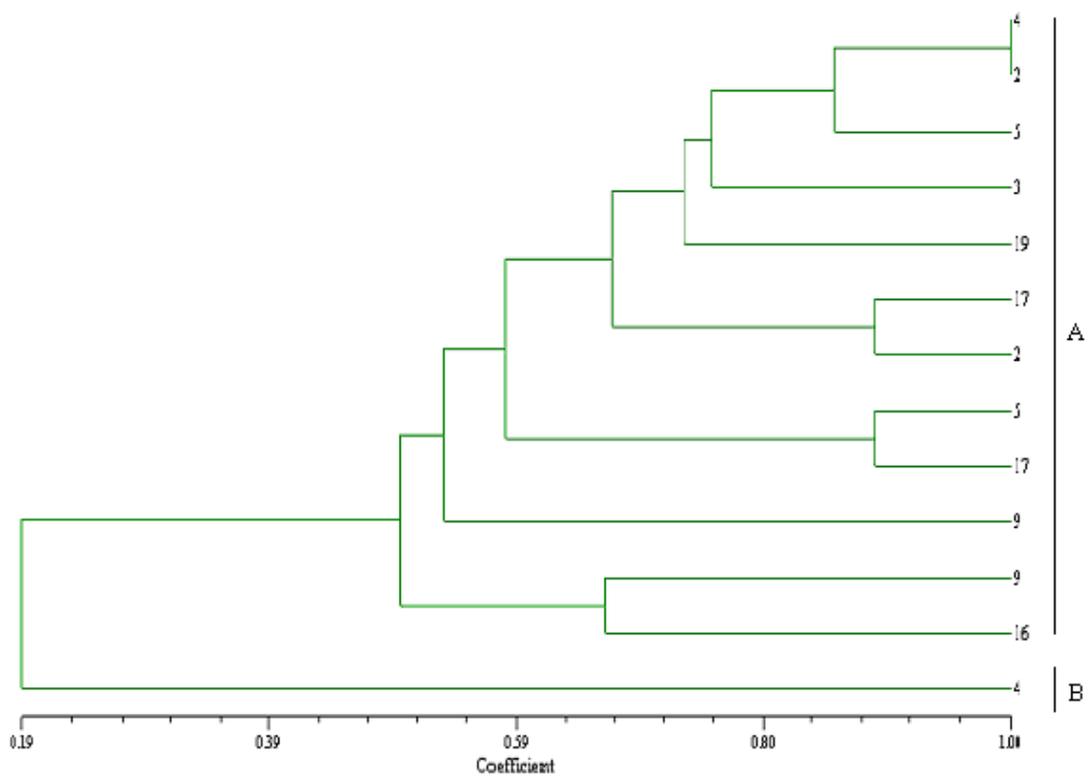


DENDROGRAMA: RESISTENCIA A AMPICILINA, TETRACICLINA

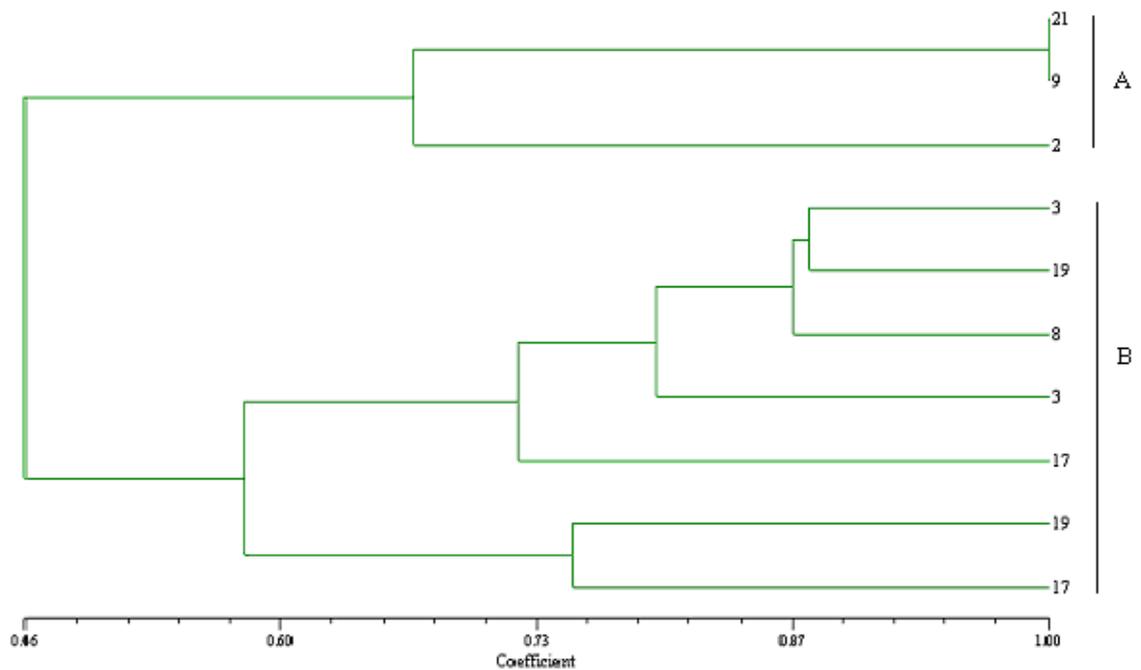


COMUNIDADES

1. Ranchito
2. La Loma
3. San Agustín
4. Timbiré
5. Colón Eloy
6. Quinto Piso
7. La Peña
8. Roca fuerte
9. Wimbi
10. Guayabal
11. Playa de Oro
12. Naranjal
13. Las Cruces
14. Vaquerita
15. Tangaré
16. Arenales
17. Sto. Domingo
18. El Rosario
19. Telembi
20. Trinidad
21. San Miguel



DENDROGRAMA: RESISTENCIA A TETRACICLINA. TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL

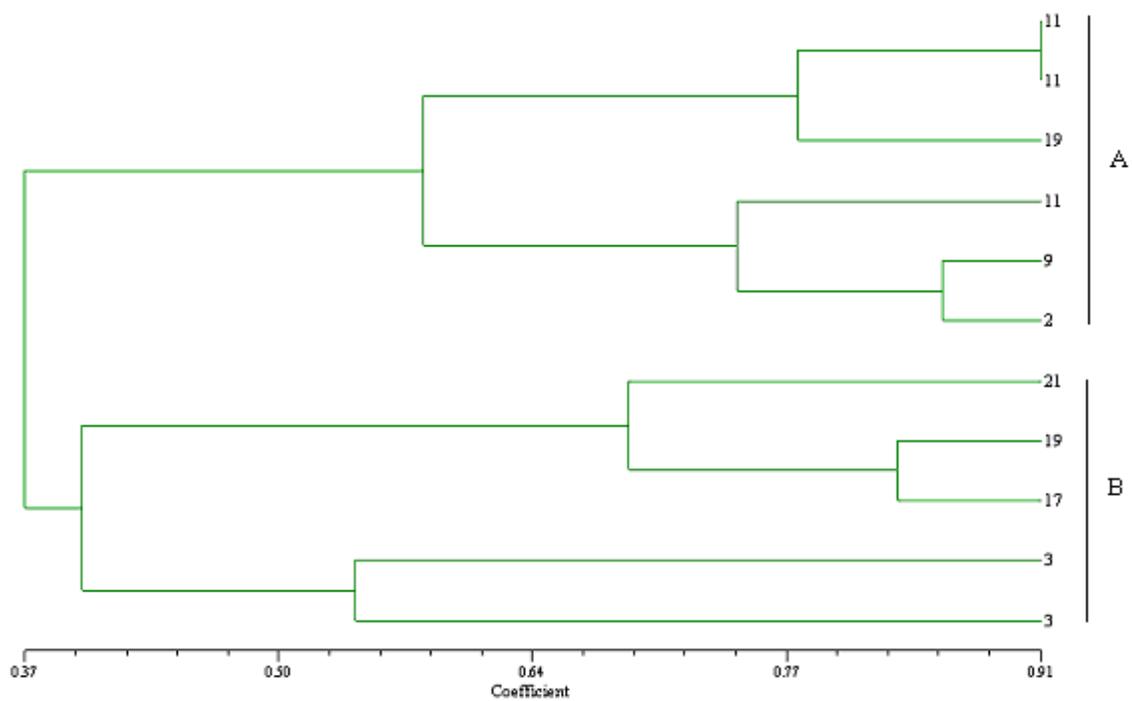


**DENDROGRAMA: RESISTENCIA A
AMPICILINA, TETRACICLINA, CLORANFENICOL TRIMETOPRIM-
SULFAMETOXAZOL**

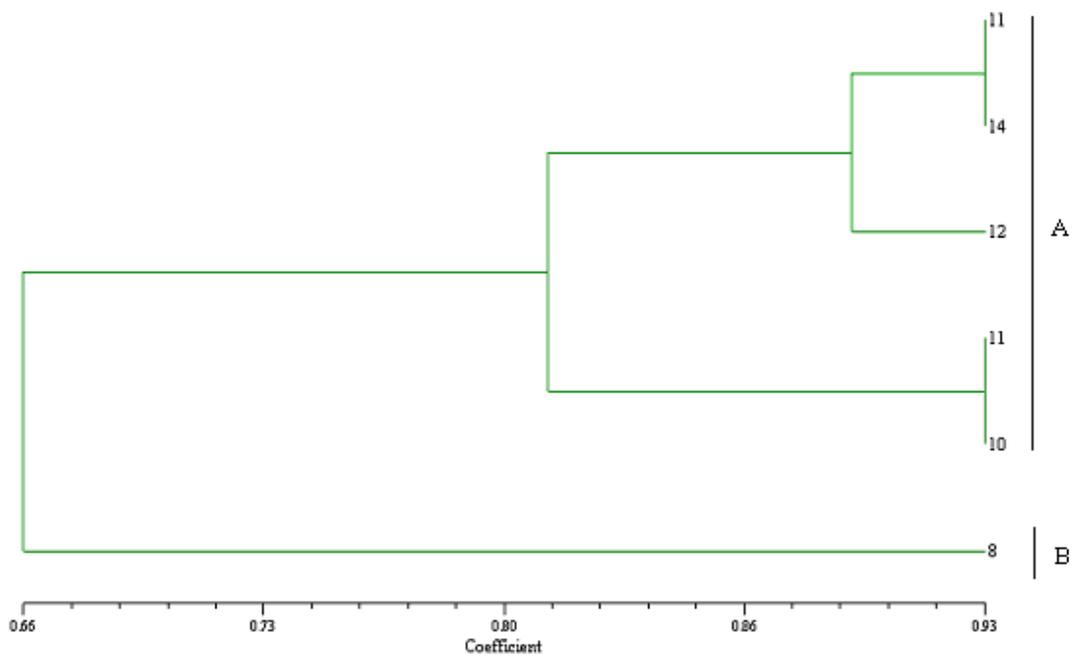


COMUNIDADES

1. Ranchito
2. La Loma
3. San Agustín
4. Timbiré
5. Colón Eloy
6. Quinto Piso
7. La Peña
8. Roca fuerte
9. Wimbi
10. Guayabal
11. Playa de Oro
12. Naranjal
13. Las Cruces
14. Vaquerita
15. Tangaré
16. Arenales
17. Sto. Domingo
18. El Rosario
19. Telembi
20. Trinidad
21. San Miguel



DENDROGRAMA: RESISTENCIA A AMPICILINA

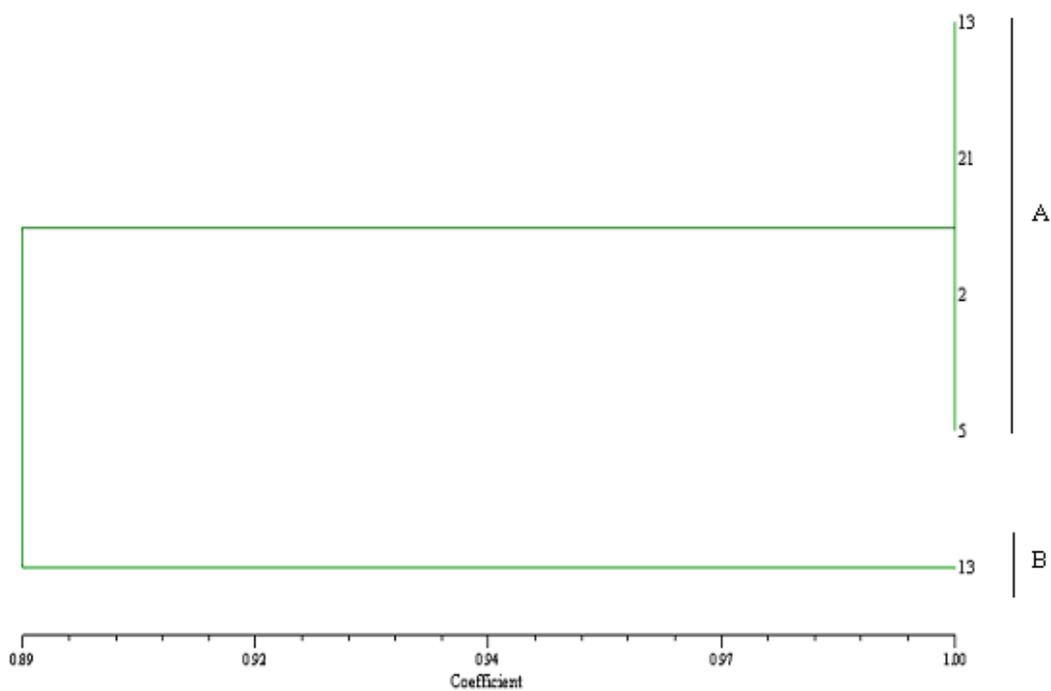


DENDROGRAMA: RESISTENCIA A TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL



COMUNIDADES

1. Ranchito
2. La Loma
3. San Agustín
4. Timbiré
5. Colón Eloy
6. Quinto Piso
7. La Peña
8. Roca fuerte
9. Wimbi
10. Guayabal
11. Playa de Oro
12. Naranjal
13. Las Cruces
14. Vaquerita
15. Tangaré
16. Arenales
17. Sto. Domingo
18. El Rosario
19. Telembi
20. Trinidad
21. San Miguel

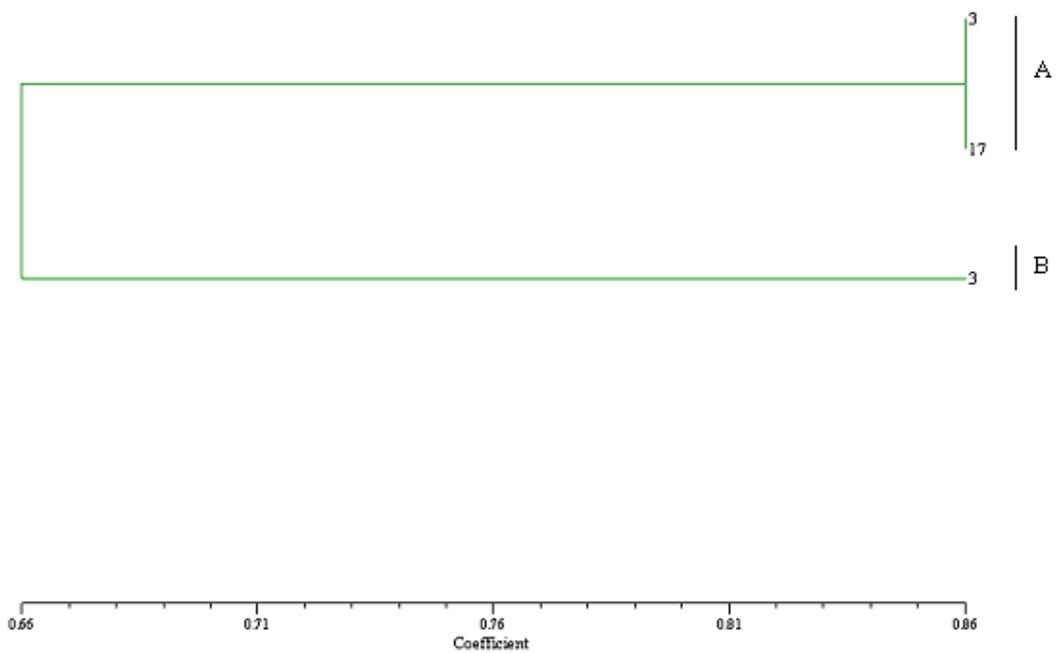


DENDROGRAMA: RESISTENCIA A AMPICILINA, TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL



COMUNIDADES

1. Ranchito
2. La Loma
3. San Agustín
4. Timbiré
5. Colón Eloy
6. Quinto Piso
7. La Peña
8. Roca fuerte
9. Wimbi
10. Guayabal
11. Playa de Oro
12. Naranjal
13. Las Cruces
14. Vaquerita
15. Tangaré
16. Arenales
17. Sto. Domingo
18. El Rosario
19. Telembi
20. Trinidad
21. San Miguel

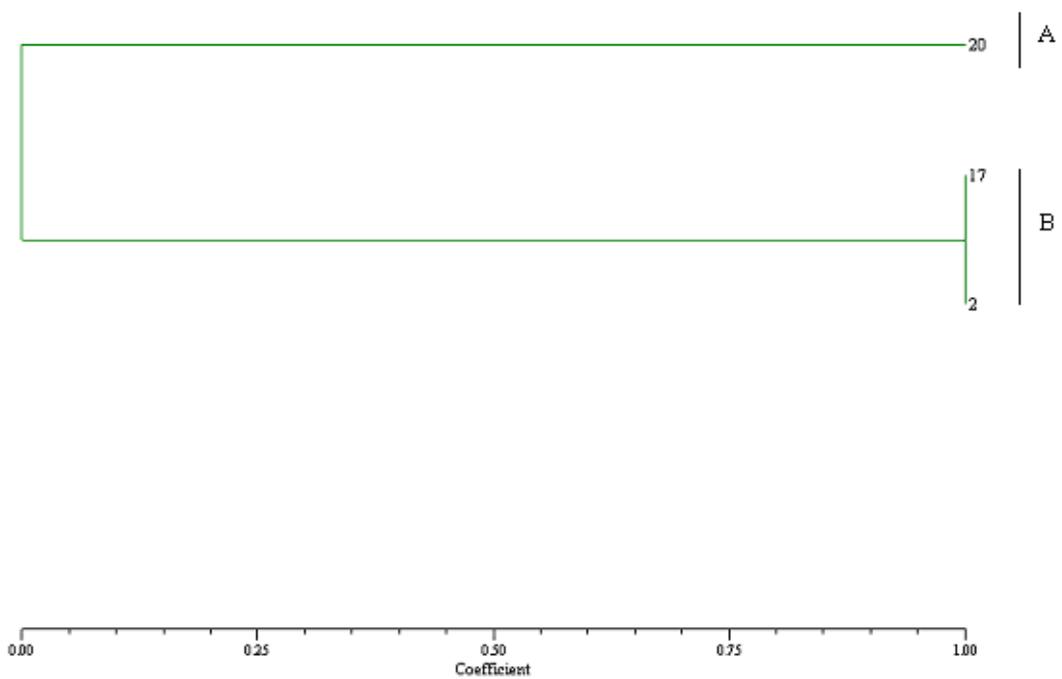


**DENDROGRAMA: RESISTENCIA A AMPICILINA, CLORANFENICOL,
TETRACICLINA**



COMUNIDADES

1. Ranchito
2. La Loma
3. San Agustín
4. Timbiré
5. Colón Eloy
6. Quinto Piso
7. La Peña
8. Roca fuerte
9. Wimbi
10. Guayabal
11. Playa de Oro
12. Naranjal
13. Las Cruces
14. Vaquerita
15. Tangaré
16. Arenales
17. Sto. Domingo
18. El Rosario
19. Telembi
20. Trinidad
21. San Miguel



**DENDROGRAMA: RESISTENCIA A AMPICILINA, CLORANFENICOL,
TETRACICLINA,CIPROFLOXACINO,TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL**



COMUNIDADES

1. Ranchito
2. La Loma
3. San Agustín
4. Timbiré
5. Colón Eloy
6. Quinto Piso
7. La Peña
8. Roca fuerte
9. Wimbi
10. Guayabal
11. Playa de Oro
12. Naranjal
13. Las Cruces
14. Vaquerita
15. Tangaré
16. Arenales
17. Sto. Domingo
18. El Rosario
19. Telembi
20. Trinidad
21. San Miguel

9
A
3

1
0.02
Coefficient

