



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Identificación y caracterización de integrones
asociados a la resistencia antimicrobiana, en aislados
de *escherichia coli* provenientes de niños menores de
dos años con diarrea y bacteremia de Lima, Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Maribel Denise RIVEROS RAMIREZ

ASESORES

Mg. Ruth GARCÍA DE LA GUARDA

Dra. Theresa OCHOA WOODSELL

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Riveros, M. (2019). *Identificación y caracterización de integrones asociados a la resistencia antimicrobiana, en aislados de escherichia coli provenientes de niños menores de dos años con diarrea y bacteremia de Lima, Perú*. Tesis para optar el grado de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0001-8341-7802
DNI o pasaporte del autor	41568960
Código ORCID del asesor	0000-0002-5100-0452
DNI o pasaporte del asesor	Obligatorio. Para asesores extranjeros
Grupo de investigación	Laboratorio de Enfermedades Entéricas, Nutrición y Resistencia Antimicrobiana.
Agencia financiadora	ND
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	San Martín de Porres Latitud: -12.050768 Longitud: -77.028096
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2013-2015
Disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01

Nota: tomar en cuenta la forma de llenado según las precisiones señaladas en la web (las tablas OCDE están incluidas).
https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios_30junio.pdf



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 178-UPG-FCB-2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Siendo las 10:00... horas del día 18.9.2019... en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Dra. Elydía Cornelia Mujica Albán	e integrado por
Mg. Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre	(Miembro)
Dra. Liz Erika Cruz Pio	(Miembro)
Mg. Ruth Hortensia García de la Guarda	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la Bachiller Doña **MARIBEL DENISE RIVEROS RAMÍREZ**.

Después de darse lectura al Expediente N° 178-UPG-FCB-19, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, receptionaron la exposición de la Tesis Titulada:

“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES ASOCIADOS A LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA, EN AISLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE NIÑOS MENORES DE DOS AÑOS CON DIARREA Y BACTEREMIA DE LIMA, PERÚ”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú. Decana de América)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO


UNIDAD DE POSGRADO


Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Excelente con la nota de 19


A continuación el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular a la Bachiller **MARIBEL DENISE RIVEROS RAMÍREZ.**


Siendo las 11:30 se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 18 días del mes de setiembre del año 2019.


.....
Dra. Elydia C. Mujica Albán
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE
REGINA N° 4860


.....
Mg. Ruth H. García de la Guarda
Profesor Principal a D. E.
ASESORA
REGINA N° 15295


.....
Mg. Débora E. Alvarado Iparraguirre
Profesora Principal a D. E.
MIEMBRO
REGINA N° 15475


.....
Dra. Liz Erika Cruz Pio
Profesora Auxiliar a T. C.
MIEMBRO
REGINA N° 17544

AGRADECIMIENTOS

Mediante la presente quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi asesora de tesis, Dra. Theresa Ochoa quien me ha acompañado durante todo mi trayecto profesional y me ha permitido mostrar la mejor versión de mí.

A mi asesora interna, Dra. Ruth García por su apoyo sin considerar fecha ni hora, su soporte científico y revisión crítica a lo largo del posgrado me permitió culminar con esta memoria de tesis.

Al Dr. Joaquim Ruiz, por su invaluable ayuda y paciencia desde mis primeros días en el laboratorio en Barcelona, gracias por tus enseñanzas que me han permitido amar este tema de investigación y pensar en el Doctorado como un sueño alcanzable.

A mi actual jefa de Docencia, Dra. Coralith García por su amistad e insistir que no debía postergar este sueño más tiempo.

A mis amigas del Laboratorio de Barcelona, Mari Pons, Claudia Gómez, Sandra Martínez y Lidia Ruiz por su ayuda en los ensayos de laboratorio, su orientación en tierras extrañas me hicieron sentir en casa.

A mis amigas Lizeth Astocondor y Karen Ocampo por convencerme que esta tesis no era inalcanzable.

A mis amigos del Laboratorio de Infectología Pediátrica y el Laboratorio de Enfermedades Entéricas, Nutrición y Resistencia Antimicrobiana.

A Miguel quien está a mi lado compartiendo mis alegrías y angustias, por las palabras de aliento que me obligan a que me supere día con día, gracias por impulsarme a llegar hasta aquí.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, a cada uno de los docentes gracias por su acertada orientación y sus clases magistrales.

A mi jurado de tesis integrado por las profesoras Elydia Mujica, Debora Alvarado y Liz Cruz, muchas gracias por el tiempo dedicado en la revisión detallada de esta tesis, su acertada orientación y soporte me permitió seguir aprendiendo. Al personal administrativo de posgrado, sobre todo a Dorita por la ayuda y paciencia durante el trámite.

A la Agencia Española AECID quien como parte del proyecto A1/035720/11 financiaron mi estadía en España.

DEDICATORIA

A Dios, por fortalecer mis convicciones y permitir que mis seres queridos continúen a mi lado siendo mi principal soporte y compañía, por los momentos felices que me permitieron impulsar este trabajo y por los momentos difíciles que me permitieron reconocer que este era uno de mis sueños. A mi madre, Maria Esther Ramírez Matos, mamá gracias por volverme a apoyar y apostar por mí, quererme mucho, ser mi ángel de la guarda incondicional, todo esto te lo debo a ti. A mi padre, Antonio Riveros Capcha por ser el ejemplo de perseverancia y constancia que me ha permitido superar las dificultades en el trabajo y la vida diaria, a los dos, gracias por darme la oportunidad de vivir, por su tiempo y enseñarme que solo con trabajo y empeño puedo cumplir mis sueños. A mis hermanos Toño, William, Sally, Victor, Victoria, Gustavo y Joselyn porque pasa el tiempo y seguimos siendo un gran equipo. A mis bellos sobrinos Milagros, Guadalupe, Estefano, Victor Javier, Valentina, y Bianca gracias por permitirme inculcar esta bella profesión en ustedes.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIEC	<i>Escherichia coli</i> adherente invasivo
AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
AZM	Aztreonam
BLEE	β -Lactamasas de Espectro Extendido
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasas
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
SC	Secuencias conservadas
CTX	Cefotaxima
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarrogénica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ExPEC	<i>E. coli</i> patogénica extraintestinal
GEN	Gentamicina

IS	Secuencia de inserción
LGT	Transferencia lateral de genes
MDR	Multirresistente
NAL	Ácido nalidíxico
NIT	Nitrofurantoina
NMEC	<i>Escherichia coli</i> de meningitis neonatal
OMS	Organización Mundial de la Salud
RFLP-PCR	Polimorfismo de los fragmentos de restricción de los productos de PCR
RV1	Región variable 1
RV2	Región variable 2
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
STX	Trimetoprima/sulfametoxazol
TET	Tetraciclina
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. ANTECEDENTES.....	9
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
VI. RESULTADOS.....	33
VII. DISCUSIÓN.....	43
VIII. CONCLUSIONES.....	49
IX. RECOMENDACIONES.....	50
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
XI. ANEXOS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Muertes atribuibles a la resistencia antimicrobiana y a otras enfermedades en el 2050.....	8
Figura 2. Sitios de colonización patogénica de <i>Escherichia coli</i>	10
Figura 3. Estructura de una secuencia de inserción.....	15
Figura 4. Estructura de un transposón de resistencia antimicrobiana.....	16
Figura 5. Mapa genético de un plásmido de resistencia (R100).....	17
Figura 6. Estructura general de un integrón.....	18
Figura 7. Mecanismos de captura de genes mediada por los integrones y el modelo para el intercambio de <i>cassette</i>	21
Figura 8. Estructura general de un integrón de clase 1.....	23
Figura 9. Estructura general de un integrón de clase 2.....	24
Figura 10. Flujograma de identificación de integrones de clase 1 y clase 2.....	29
Figura 11. El método de doble disco para la detección de BLEE.....	33
Figura 12. Identificación de integrones de clase 1 en aislados de bacteremia.....	35
Figura 13. Identificación de integrones de clase 2 en aislados de EPEC	35
Figura 14. Identificación de RV2 en aislados de EAEC.....	37
Figura 15. RFLP de RV1 de EAEC.....	38
Figura 16. Secuenciamiento de los genes de resistencia <i>dfrA17</i> y <i>aadA5</i> de aislados de Bacteremia.....	39
Figura 17. Alineamiento de secuencia múltiple de los genes de resistencia <i>dfrA17</i> y <i>aadA5</i> de aislados de Bacteremia.....	41

Figura 18. Grafica de la secuencia de codificación completa (CDS) de los genes de resistencia <i>dfrA17</i> y <i>aadA5</i> de aislados de Bacteremia.....	42
Figura 19. Prueba de doble disco positiva para BLEE.....	46
Figura 20. Patrones de resistencia en aislados de <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas y de bacteremia.....	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales mecanismo de resistencia a los antimicrobianos presentes en <i>Escherichia coli</i>	13
Tabla 2. Las fuerzas colectivas que impulsan la transferencia horizontal o lateral de genes.....	14
Tabla 3. Cebadores y temperaturas de hibridación para el uso en la reacción de PCR para la detección de integrasas.....	30
Tabla 4. Cebadores y temperaturas de hibridación para el uso en la reacción de PCR para la detección de Región Variable	31
Tabla 5. Frecuencia de integrasas de Clase 1 y 2 de <i>E. coli</i> provenientes de sangre y de diarrea en niños menores de dos años.....	34
Tabla 6. Patrones de RFLP de integrones de clase 1 y 2 de <i>E. coli</i> provenientes de sangre y de diarrea en niños menores de dos años.....	37
Tabla 7. Propiedades y contenido de integrones de clase 1 y genes <i>cassette</i> provenientes de DEC y <i>E. coli</i> de bacteremia.....	40
Tabla 8. Propiedades y contenido de integrones y genes <i>cassette</i> de clase 2 provenientes de DEC y <i>E. coli</i> de bacteremia.....	41
Tabla 9. Frecuencia de integrones de clase 1 y 2 de <i>E. coli</i> provenientes de sangre y de diarrea en niños menores de dos años	42

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un problema mundial de salud pública. La transferencia horizontal de integrones permite la diseminación de bacterias multidrogasresistentes (MDR). Los integrones incorporan *cassette* de genes de resistencia garantizando su expresión. Este estudio describe la resistencia antimicrobiana, detecta y caracteriza los integrones de clase 1 y 2 en aislados de *Escherichia coli* provenientes de niños menores de dos años con diarrea y bacteremia. Para ello, se obtuvieron 355 aislados de *E. coli* de diarrea y bacteremia de pacientes pediátricos de dos estudios previos recolectados aleatoriamente: 129 *E. coli* enteropatogénica (EPEC), 90 *E. coli* enteroagregativa (EAEC), 66 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y 70 *E. coli* de bacteremia. La presencia de genes de integrasa (*intl*) e integrones de clase 1 (*IntI1*) y 2 (*IntI2*) fue detectada mediante la reacción en cadena de polimerasa, los *cassettes* génicos fueron caracterizados por RFLP y secuenciamiento. Los integrones solo de clase 1 fueron más frecuentes y asociados significativamente con los aislados de bacteremia 31 % (22/70), en *E. coli* diarreogénicas, EAEC fue la más frecuente con 24% (22/90), seguido de EPEC con 9% (11/129) y ETEC con 6% (4/66). La presencia de solo integrasa 2 fue similar en EPEC 4% (5/129), EAEC 3% (3/90) y bacteremia 6% (4/70). Solo ETEC presentó un aislado con ambos tipos de integrones. En total se detectaron 15 *cassettes* génicos, 12 de clase 1 y 3 de clase 2, que confieren resistencia a los aminoglucósidos (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*), a gentamicina / tobramicina / kanamicina (*aadB*), a trimetoprima (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17*), a cloranfenicol (*catB3*) y 1 ORF (marco de lectura abierta). Solo en integrones de clase 2 se identificaron tres *cassettes* génicos de estreptotricina acetiltransferasa (*sat 1*, *2* y *3*) que confieren resistencia a la estreptotricina. La mayoría de aislados con integrones 1 y 2 fueron mutiresistentes. Aislados de bacteremia con integrones de tipo 1 presentaron β -Lactamasas de Espectro Extendido en 59% (13/33). Por lo tanto *E. coli* provenientes de heces y sangre en niños peruanos presentan multiresistencia y albergan integrones de clase 1 y 2 con una variedad de genes *cassette*.

Palabras claves: bacteremia, *cassettes* génicos, *Escherichia coli* diarreogénicas, integrones, mutiresistente, resistencia antibiótica.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a global public health problem. The horizontal transfer of integrons allows the spread of multidrug-resistant bacteria (MDR). The integrons incorporate resistance gene cassette guaranteeing their expression. This study describes antimicrobial resistance, detects and characterizes class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolates from children under two years of age with diarrhea and bacteremia. To do this, 355 isolates of diarrhea and bacteremia *E. coli* were obtained from pediatric patients from two previous randomly collected studies: 129 enteropathogenic *E. coli* (EPEC), 90 enteroagregative *E. coli* (EAEC), 66 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)) and 70 *E. coli* bacteremia. The presence of integrase (*intI*) and integron genes of class 1 (*IntI1*) and 2 (*IntI2*) was detected by polymerase chain reaction, gene cassettes were characterized by RFLP and sequencing. Class 1 only integrons were more frequent and significantly associated with 31% (22/70) bacteremia isolates, in diarrheal *E. coli*, EAEC was the most frequent with 24% (22/90), followed by EPEC with 9 % (11/129) and ETEC with 6% (4/66). The presence of only integrase 2 was similar in EPEC 4% (5/129), EAEC 3% (3/90) and bacteremia 6% (4/70). Only ETEC presented an isolate with both types of integrons. In total, 15 gene cassettes, 12 of class 1 and 3 of class 2, which confer resistance to aminoglycosides (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*), gentamicin / tobramycin / kanamycin (*aadB*), trimethoprim (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17*), chloramphenicol (*catB3*) and 1 ORF (open reading frame). Only in class 2 integrons were three streptotricin acetyltransferase gene cassettes (*sat* 1, 2 and 3) conferring streptotricin resistance. The majority of isolates with integrons 1 and 2 were multiresistant. Isolates of bacteremia with type 1 integrons showed 59% (13/33) of Extended Spectrum β -Lactamases. Therefore, *E. coli* from feces and blood in Peruvian children have multiresistance and house class 1 and 2 integrons with a variety of cassette genes.

Key words: bacteremia, gene cassettes, diarrheogenic *Escherichia coli*, integrons, multiresistant, antibiotic resistance.

I. INTRODUCCIÓN

Una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años de edad en el mundo es la diarrea (Steel, 2017). *Escherichia coli* es una de los principales agentes causales de diarrea en este grupo etario (Torres, 2016). En países desarrollados la bacteremia representa la mayor causa de muertes, y nuevamente *E. coli* es uno de los principales agentes patógenos bacterianos Gram-negativos involucrados (Martin y col., 2003; Laupland y col., 2008). Tanto *E. coli* extraintestinales provenientes de bacteremia como las diarreogénicas presentan altos niveles de resistencia a los antibióticos (Vila y col., 1999; Martin y col., 2003; Pons y col., 2014; Palma y col., 2016), esto ha complicado el tratamiento y cura efectiva de las infecciones causadas por estos patógenos frecuentes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha diseñado un plan mundial sobre resistencia a los antimicrobianos en el que se establecen 5 objetivos, dentro de los cuales el objetivo 2 plantea fortalecer los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación para contrarrestar la crisis a causa de la generación de nuevas bacterias potencialmente resistentes a los fármacos y su diseminación (OMS, 2016). La resistencia antimicrobiana lleva consigo efectos cruciales como una prolongación y complicación de la enfermedad que, eventualmente, podría desencadenar en la muerte. Solo en Estados Unidos y Europa, más de 50.000 personas mueren al año por esta causa (ISGlobal, 2017). En la India, cerca de 60.000 recién nacidos mueren por infecciones con bacterias resistentes a los antibióticos existentes (Laxminarayan y col., 2013). Como consecuencia estos pacientes suelen tener un tratamiento complicado con estancias prolongadas, produciendo así un impacto económico en el sistema de salud del país. Por ejemplo, en el Viejo Mundo, se produce un gasto de hasta 1.500 millones de euros al año (KPMG, 2014). El Perú no es ajeno a este fenómeno. Ochoa y col., 2009, han descrito la resistencia en *E. coli* diarreogénicas y concluyen que la presencia de resistencia antimicrobiana refleja la alta exposición a antibióticos en pacientes con gastroenteritis. Similarmente, García y col. (2012) han reportado preocupantes niveles de resistencia en cepas bacteriémicas de *E. coli*. Reportes internacionales que buscan concientizar sobre la importancia de la

resistencia a los antibióticos han informado que si este fenómeno continúa aumentando, el número de personas que morirán por esta causa en el año 2050, podría ser diez veces más alto que ahora, pudiendo alcanzarlos 10 millones de personas al año, superando las cifras de los fallecidos por cáncer, diabetes y otras enfermedades en la actualidad, así mismo el costo económico de 100.000 millones de dólares (O’neill, 2016) (Figura 1).

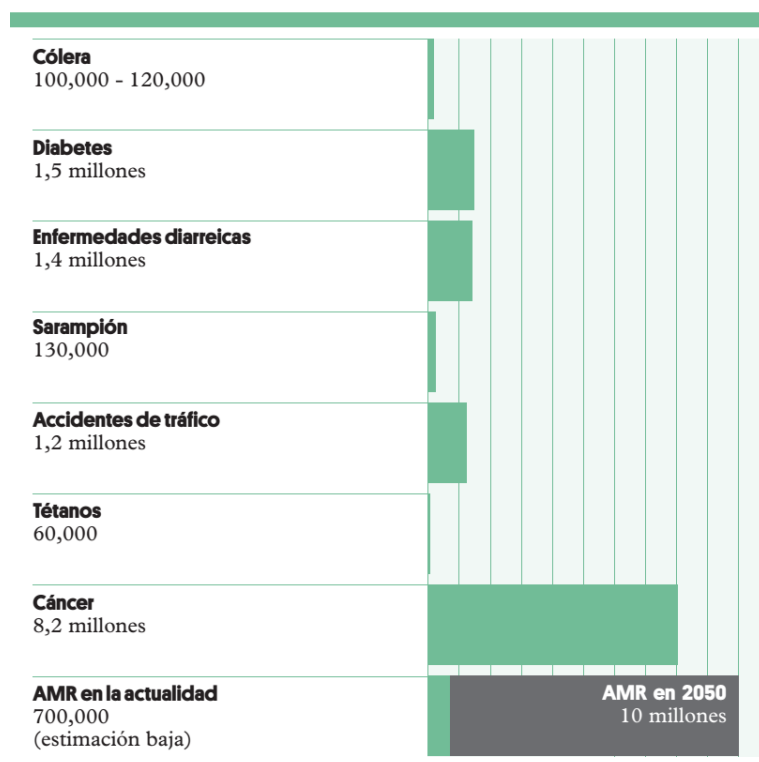


Figura 1. Muertes atribuibles a la resistencia antimicrobiana y a otras enfermedades en el 2050. Tomado de ISGlobal (2017).

Este fenómeno global tiene sus orígenes en los mecanismos de resistencia bacteriana que han ido evolucionando impresionantemente (Davies y col., 1994; Hart, 1998). Las poblaciones de bacterias con características de resistencia similares, en organismos y ecosistemas notoriamente distantes y diferentes, presumen algún efecto de flujo genético entre ellas (Levys, 1986; Doucet-Populaire y col., 1992; Salyers y Amabile-Cuevas, 1997; Courvalin, 1994; Levys, 1997). En efecto, procesos como la transformación (Cohens y

col., 1972), conjugación (Zatyk & Thomasac, 1998) y transducción (Thompson, 1994) permiten la adquisición y diseminación de genes de resistencia.

Este proceso de propagación involucra un mecanismo interesante denominado transferencia lateral de genes (LGT, por sus siglas en inglés “Lateral Genetic Transfer”) (Frost y col., 2005) que mediante elementos genéticos móviles, como secuencias de inserción (Partridge y col., 2009), transposones (Salysers y col., 1995) y los integrones con sus *cassettes* genéticos de resistencia (Stokes & Hall, 1989) son capaces de moverse dentro o entre moléculas de ADN, y aquellos que son capaces de transferirse entre células bacterianas, como plásmidos (Amábile-Cuevas & Chicurelm, 1992), asegurando su acervo genético.

Entonces, es fácil de comprender que este fenómeno, desde la adquisición de genes de resistencia hasta los estudios de la vigilancia epidemiológica, deben ser considerados según región geográfica. Por ello, este trabajo es importante porque radica en la identificación y detección de elementos móviles como los integrones de clase 1 y 2 que no han sido estudiados aún en aislados de *E. coli* en el Perú, además se caracterizan los *cassettes* genéticos mediante métodos moleculares y se interpreta el perfil de la resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* provenientes de niños menores de dos años con diarrea y bacteremia. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la presencia de genes de resistencia circulantes en nuestro país albergados en elementos genéticos como los integrones y da paso al primer reporte de elementos móviles en aislados peruanos de *E. coli*.

II. ANTECEDENTES

E. coli es una bacteria Gram negativa anaeróbica facultativa en forma de bacilo corto y que forma parte de la microbiota del intestino grueso de los seres humanos y otros mamíferos (Nataro & Kaper, 1998). Aunque *E. coli* usualmente permanece en el lumen intestinal sin perjudicar al hospedero, ciertas cepas de esta especie pueden causar un amplio espectro de enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos y otros animales (Kaper y col., 2004). En base a las características clínicas y genéticas se ha clasificado a *E. coli* en tres grandes grupos: *E. coli* comensal, *E. coli* patogénica intestinal (entérica o diarreogénica) y *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) (Russo & Johnson, 2000) (Figura 2).

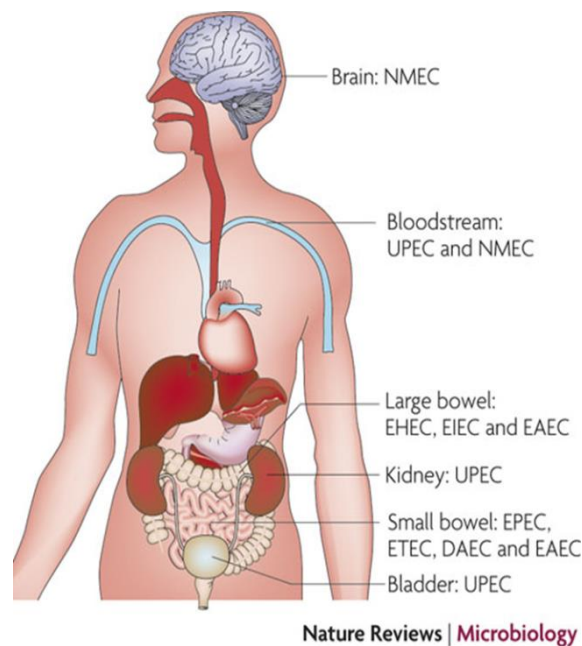


Figura 2. Sitios de colonización patogénica de *Escherichia coli*. *E. coli* diarreogénicas como EPEC, ETEC, DAEC, EHEC, EAEC y EIEC pueden colonizar el intestino delgado y grueso según corresponda. “*E. coli*” uropatogénica (UPEC) puede causar cistitis y pielonefritis. La septicemia puede ocurrir tanto con la UPEC como con “*E. coli*” de meningitis neonatal (NMEC). Tomado de Croxen & Finlay, 2010.

2.1 *E. coli* diarreogénicas (DEC).- Son cepas causantes de infecciones entéricas e incluye patógenos emergentes de relevancia en la salud pública a nivel mundial. Se han descrito diversas *E. coli* diarreogénicas, que difieren en sus factores de virulencia (Nataro & Kaper. 1998). Estos factores de virulencia permiten clasificar a las cepas DEC (por sus siglas en inglés "*Diarrhoeagenic E. coli*") en 6 diferentes patotipos: *E. coli* enterotoxigénica ("*Enterotoxigenic E. coli*" /ETEC), *E. coli* enteropatogénica ("*Enteropathogenic E. coli*" /EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga ("*Shiga toxin producing E. coli*" /STEC), *E. coli* enteroinvasiva ("*Enteroinvasive E. coli*" /EIEC), *E. coli* enteroagregativa ("*Enteraggative E. coli*" /EAEC), *E. coli* de adherencia difusa ("*Diffusely Adherent E. coli*" /DAEC) (Kaper y col., 2004) y *E. coli* adherente invasor ("*adherent invasive E. coli*" /AIEC), las cuales se han asociado a patologías inflamatorias intestinales como la Enfermedad de Crohn (Martinez-Medina & Garcia-Gil., 2014).

2.2. *E. coli* extraintestinal (ExPEC).- Estas cepas son denominadas ExPEC por ser responsables de muchas enfermedades fuera del tracto gastrointestinal. Las infecciones extraintestinales comunes causadas por ExPEC abarcan infecciones al tracto urinario, meningitis neonatal y sepsis. Además, *E. coli* es capaz de causar infecciones intra-abdominales, neumonía nosocomial, celulitis, osteomielitis e infecciones de heridas abiertas (Johnson & Russo, 2002). Varios genes de virulencia se han relacionado con la patogenicidad de ExPEC. Entre estas se incluyen toxinas, adhesinas, lipopolisacáridos, proteasas e invasinas que se codifican con frecuencia por islas de patogenicidad y otras islas móviles de ADN (Croxen & Finlay, 2010). *E. coli* provenientes de bacteremia son consideradas ExPEC.

2.3. Resistencia antibiótica de *E. coli*.- Varios estudios de vigilancia muestran que tanto ExPEC como DEC presentan resistencia a los antibióticos como ampicilina, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, fluoroquinolonas y últimamente, cefalosporinas (Sáenz y col., 2004). Estos estudios incluyen a nuestro país (Ochoa y col., 2009; García y col., 2012; Pons y col., 2014; Mosquito y col., 2015), demostrando así la complicación en el manejo antimicrobiano en microorganismos clínicamente relevantes,

producto de la expresión simultánea e incluso coordinada de múltiples genes que expresan mecanismos de resistencia, los cuales pueden ser naturales o adquiridos (Livermore y col., 2007).

2.3.1. Resistencia intrínseca y adquirida.-

La resistencia natural (intrínseca) es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, en donde los mecanismos son determinados genéticamente. Un ejemplo importantes es la resistencia a vancomicina que poseen todos los microorganismos Gram negativos (Cox & Wright, 2013).

Por el contrario, la resistencia adquirida es la adopción de un(os) gen(es) de resistencia que no pertenece(n) a la naturaleza original de una determinada especie bacteriana. Se presenta por cambios puntuales conocidos como mutaciones en el ADN o por adquirir plásmidos, transposones, integrones conocidos como elementos genéticos móviles (Blair y col., 2015). Como ejemplo de la resistencia natural se encuentran las mutaciones en los genes que codifican las proteínas denominadas porinas. Esto tiene como consecuencia el bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo. Mientras que, para la resistencia adquirida, un ejemplo claro y muy frecuente es la adquisición de una betalactamasa de espectro extendido debido a la incorporación de algún plásmido que alberga algún gen que permita la expresión de una enzima que hidrolice los betalactámicos.

Esta resistencia adquirida puede conseguirse por tres procesos básicos implicados en la transferencia horizontal de genes: transformación, transducción y conjugación. (Stokes & Gillings, 2011; Huddleston y col. 2014; von Wintersdorff y col. 2016).

2.3.2. Mecanismos de resistencia bacteriana

En la actualidad se ha descrito una gran variedad de mecanismos de resistencia a antimicrobianos. Así, en *Escherichia coli* se han descrito alteraciones cromosomales, como presencia de cambios aminoacídicos puntuales en las dianas, que previenen la unión del antibiótico (o en el caso de las alteraciones en NfsA o NfsB, que impiden se active el antibiótico),

problemas de acumulación del antibiótico en el interior bacteriano debidos a descensos en la permeabilidad o a incrementos de expulsión activa, sistemas para modificar e inactivar el antibiótico o desarrollo de vías alternativas a la bloqueada por el antibiótico entre otros mecanismos de resistencia (Tabla 1). De hecho, se conocen mecanismos de resistencia para todos los antimicrobianos introducidos en la práctica clínica o veterinaria.

Tabla 1: Principales mecanismos de resistencia a antimicrobianos presentes en *Escherichia coli*.

Mecanismo	Ejemplo [Antibiótico]
↓ Acceso del antibiótico a su diana	
↓ Permeabilidad	↓ OmpF (Múltiples)
↑ Expulsión Activa*	↑ AcrAB-TolC (Múltiples); <i>mef(A)</i> [macrólidos]; <i>qepA</i> [fluoroquinolonas]; bombas tipo <i>tet</i> [tetraciclinas]
Protección de la Diana	<i>qnr</i> (quinolonas)
Acción sobre el antimicrobiano	
Modificación / Inactivación	<i>arr</i> [rifamicinas]; β-lactamasas [β-lactámicos]; EMAGs [aminoglucósidos]; <i>floR</i> [cloranfenicol]; <i>mph(A)</i> [macrólidos]
Modificación de la diana	
Mutaciones puntuales	NfsA/NfsB [Nitrofuranos]; RpoB [rifamicina]; Topoisomerasas tipo II [quinolonas]; 23S <i>rRNA</i> [macrólidos, cloranfenicol];
Modificaciones post-transcripción	<i>erm(B)</i> [macrólidos]
Desarrollo de vías metabólicas alternativas	
Vías alternativas	<i>dfr</i> [trimetoprima]

* Ya sea por incremento de expresión o actividad de bombas de expulsión cromosomales (ej: AcrAB-TolC) o por la adquisición de bombas de expulsión transferibles (ej: *mef(A)*, *qepA*; *tet(A)*)

La lista de ejemplos no es exhaustiva

EMAG: Enzima modificante de aminoglucósidos (uno de ellos la AAC(6')Ib-cr también afecta algunas fluoroquinolonas).

2.4 Transferencia lateral u horizontal de genes.-

Uno de los factores más importantes en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos es la notable capacidad de las bacterias para compartir recursos genéticos a través de la transferencia lateral de genes. La LGT requiere que al menos dos procesos independientes se produzcan: (1) el movimiento físico de ADN y (2) la incorporación en el genoma receptor para permitir la herencia estable y pasar a formar parte de su acervo genético (Frost y col., 2005). Cada uno de estos dos pasos puede ocurrir a través de un número relativamente pequeño de mecanismos. El movimiento físico o mecanismo de transferencia puede producirse por conjugación, transducción o transformación; mientras que el mecanismo de incorporación de ADN puede realizarse por recombinación homóloga, transposición y recombinación específica de sitio (Thomas & Nielsen, 2005). Un resultado exitoso de transferencia requiere de al menos uno de los procesos de movimiento y uno de incorporación (Tabla 2).

Tabla 2. Las fuerzas colectivas que impulsan la transferencia horizontal o lateral de genes.

Mecanismo de transferencia	Mecanismos de integración	Elementos móviles(*)
Conjugación	1.Replicación autónoma	Plásmidos ^a (1)
Transformación	2.Transposición	Transposones (2)
Transducción	3.Recombinación sitio-específica	Secuencia de inserción (2)
	4.Recombinación homóloga	Elementos de integración y conjugación (3)
		<i>cassettes</i> génicos (3)
		Integrones ^b (3 y 4)

Un evento de LGT exitoso requiere la acción de al menos un mecanismo de transferencia y un mecanismo de integración. (*) Los números entre paréntesis identifican el principal mecanismo de incorporación. ^aLos plásmidos y los elementos de integración y conjugación son también agentes de transferencia génica porque pueden mover genes entre células por conjugación, así como integrarlos.

^b Los integrones carecen de la capacidad de movilidad autónoma, sin embargo, se han asociado con transposones y plásmidos (o ambos). Entonces, la recombinación homóloga puede considerarse un mecanismo integrador para cualquiera de los elementos enumerados (Tomado de Stokes & Gillings, 2011).

2.5 Elementos genéticos móviles.-

La captura, acumulación y diseminación de los genes de resistencia se deben en gran medida a las acciones de los elementos genéticos móviles, un término usado para mencionar a los elementos que realizan la movilidad intracelular del ADN, un ejemplo importante son los integrones (In), secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn) o los que permiten la movilidad intercelular del ADN permitiendo el mantenimiento en el genoma receptor (por ejemplo, un plásmido entre bacteria y bacteria) (Frost y col., 2005; Partridge y col., 2009)

Una **secuencia de inserción (IS)** Son elementos transponibles pequeños (de 1000 pb., o menos), dotadas en sus extremos de terminales inversamente repetidos, de unos 15 a 25 pb, junto con uno o dos genes que codifican una transposasa (una proteína con actividad de recombinasa). Basándose en un reconocimiento específico del sitio, las IS llevan un gen de resistencia, por ejemplo un gen de betalactamasa, y su secuencia promotora durante la transposición (Siguier y col., 2006) (Figura 3).

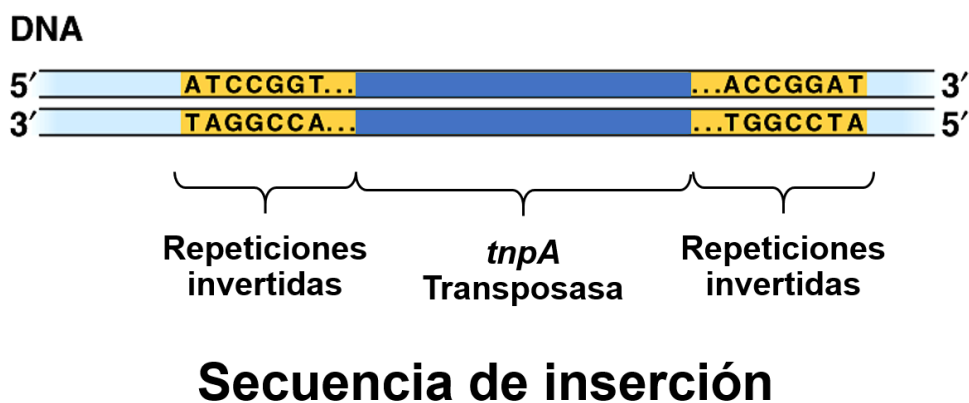
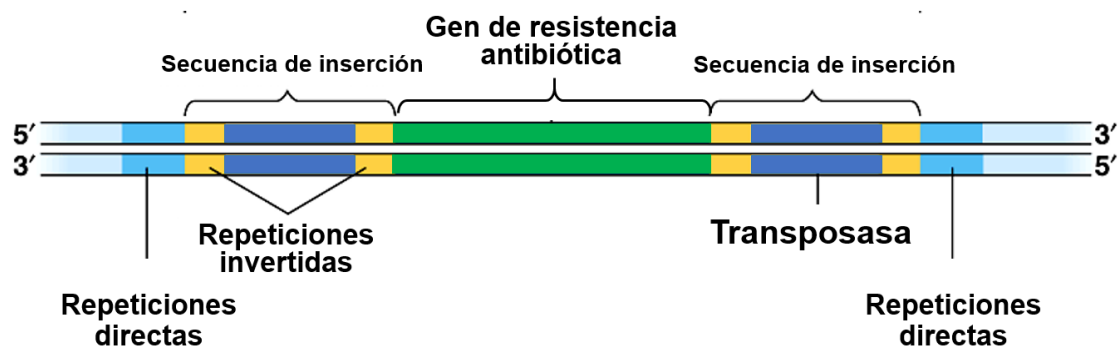


Figura 3. Estructura de una secuencia de inserción. Secuencia que posee dos repeticiones invertidas que flanquean los genes necesarios para su transposición: *tnpA* (transposasa) (Modificado de Di Conza, 2013).

Un **transposón** es una forma de IS más complejo (desde casi 3.000 pb hasta más de 20.000 pb). Son elementos genéticos transponibles los cuales albergan genes que pueden ser de resistencia, virulencia, etc. y por lo tanto, son capaces de llevar más de un determinante genético. Cuentan con la ventaja de ser translocados entre de un cromosoma , entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmidos debido a que cuenta con un sistema de recombinación propia (Figura 4).



Transposón

Figura 4. Estructura de un transposón de resistencia antimicrobiana.

(Modificado de Russell, 2002).

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena que se replican de forma autónoma en una célula huésped. Varían en longitud de unos pocos a varios cientos de pares de kilobases (Carattoli, 2013). Contienen genes que son esenciales para las funciones de mantenimiento de los plásmidos, tales como la iniciación y el control de la replicación (Figura 5). Algunos contienen genes que controlan los rasgos que garantizan una herencia estable durante la división celular o transferencia genética. Muchos plásmidos contienen genes que controlan la resistencia a los fármacos, degradación de compuestos orgánicos y factores de virulencia, incluyendo la producción de toxinas. Estos tipos de genes se localizan con frecuencia dentro de transposones, y esto ha creado una gran cantidad de variación y flexibilidad en la constitución de los plásmidos (Couturier y col., 1988).

Un plásmido de resistencia antibiótica o plásmido R, es cualquier plásmido que lleva uno o más genes de resistencia a los antibióticos, entre estos se encuentran comúnmente las cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Bennett, 2008).

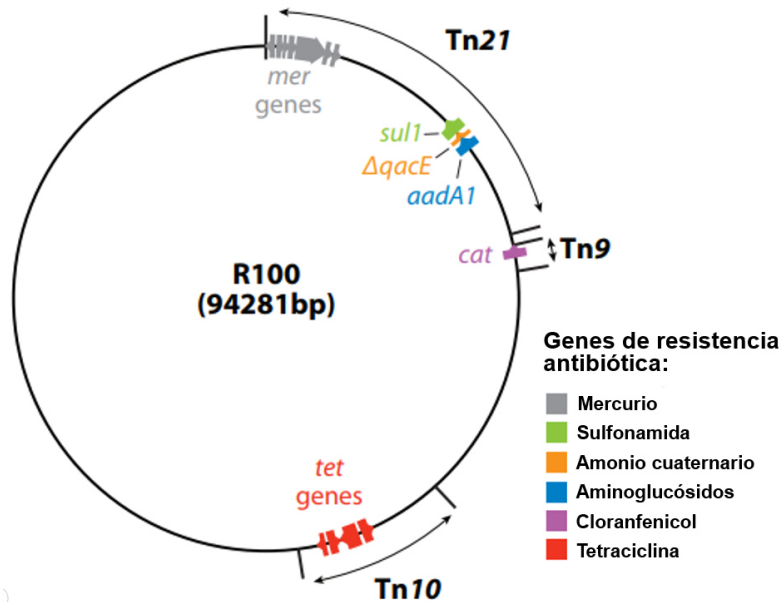


Figura 5. Mapa genético de un plásmido de resistencia (R100). *cat*: gen de resistencia a cloranfenicol, *str*: gen de resistencia a estreptomicina, *sul*: gen de resistencia a sulfonamida, *mer*: gen de resistencia al ion mercurio, IS: secuencia de inserción (Modificado de Nikaido, 2009).

2.6 Integrones

El mejoramiento de los métodos de secuenciación junto al análisis computacional permitieron reconocer nuevas plataformas genéticas, hoy conocidas como integrones (Boucher y col., 2007; Cambray y col., 2010). Un integron se denomina a una unidad genética que se constituye por un sistema de recombinación específico de sitio, capaz de captar e integrar *cassette* de genes. Los transposones, secuencias de inserción y plásmidos conjugativos son plataformas que en asociación con los integrones, sirven como vehículos principales para la propagación de genes de resistencia antibiótica intra e inter-especies (Hall & Collis, 1995).

2.6.1 Estructura de un integrón

Los integrones se describieron inicialmente a finales de la década de 1980 (Stokes & Hall, 1989). Stoke y Hall observaron que las secuencias de ADN con genes de resistencia curiosamente presentaban tres regiones particulares en su estructura básica: dos regiones o secuencias conservadas (SC) y una región variable (RV). Las dos SC se encuentran por una parte en el extremo 5' conservado (denominado, 5'-SC) de 1,36 kb y en el extremo 3' conservado (denominado, 3'-SC) de 2 kb (Figura 6).

En tanto, la RV está conformada por tres elementos esenciales: una región conservada que codifica una integrasa (*intI*), seguido por un fragmento donde se da lugar a la recombinación sitio-específico (*attI*) y finalmente un promotor (Pc) que permite la expresión de los *cassettes* genéticos integrados, es posible que en algunos casos se encuentre un segundo promotor más fuerte, P2.

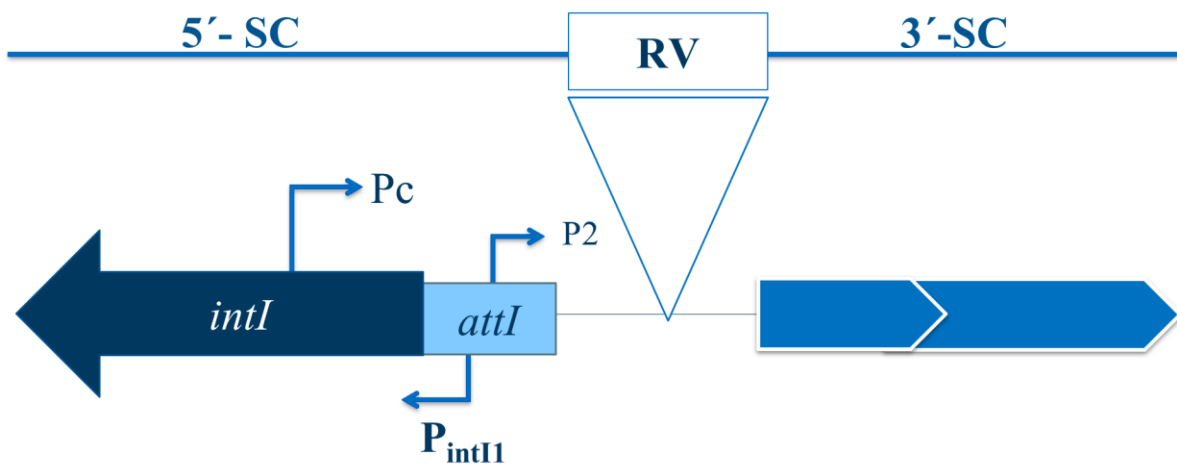


Figura 6. Estructura general de un integrón. 5'-SC: Segmento conservado 5' (5'-SC), 3'-SC: Segmento conservado 3' (3'-SC), RV: región variable (ubicación de los *cassettes* genéticos), *intI*: fragmento que codifica la enzima integrasa, *P_{intI1}*: Promotor que dirige la expresión de la integrasa, *P_c*: promotor que permite la expresión de los *cassettes* genéticos y *P2*: segundo promotor más fuerte, *attI*: secuencia de recombinación a la que se unen los genes *cassette* (Modificado de Di Conza & Gutkind, 2010).

Integrasa.-

Definido por la presencia de un gen *intl* de aproximadamente 1 kb ubicado en la región conservada, codifica una proteína tirosina recombinasa. La integrasa cataliza la recombinación en el lugar de recombinación específico (*attI*) y el sitio de recombinación del *cassette* genético (*attC*), dirigiendo y permitiendo la integración o eliminación del *cassette* de resistencia en la región variable del integrón (González y col., 2004) (Figura 6).

Sitio de recombinación.-

Para permitir la integración de los genes *cassette* de resistencia, los integrones, cuentan con una zona continua al gen *intl* conocido como el sitio de recombinación específica de sitio, *attI*, en el que se integra el *cassette* genético que es reconocido por esta secuencia de la integrasa (Di Conza & Gutkind, 2010), constituido por 65 pb y que involucra 2 regiones, una de unión fuerte y otra de unión débil de la integrasa (Recchia & Sherratt, 2002).

Promotores.-

Situado río arriba (*upstream*) del sitio de integración, el promotor (Pc) es necesario para la transcripción y expresión eficaz de los *cassettes* genéticos insertados corriente abajo (*downstream*) (Domingues y col., 2012). También es posible la existencia de un segundo promotor más fuerte, denominado P2. Aunque se supone que el promotor Pc forma parte de todas las clases de integrones, su presencia y actividad no se ha demostrado para todos ellos (Levesque y col., 1995). Entre *intl* y *attI* se encuentra Pi, importante promotor para la expresión de la integrasa (*intl*) (Recchia & Sherratt, 2002) (Figura 6).

Cassettes genéticos.-

Los integrones han adquirido importancia en el estudio de la resistencia antimicrobiana debido a que pueden integrar o escindir uno o varios genes exógenos conocidos como *cassettes* genéticos que codifican proteínas particulares de resistencia a los antimicrobianos, dando paso a la multiresistencia (Sabaté & Prats, 2002). Si observamos al detalle la estructura

de este *cassette* genético, observaremos que es un gen asociado con un elemento de 59 pb (sitio *attC*) que permite que el gen se incorpore a un integrón mediante la enzima integrasa. La figura 7, muestra el esquema del proceso mediante el cual se insertan repetidamente *cassettes* de genes circulares de resistencia a compuestos antibacterianos son muy variados incluyendo genes de resistencia a aminoglucósidos (Reyes y col., 2003), trimetoprima (Ho y col., 2009), sulfonamidas, tetraciclinas (Vinué y col., 2008), rifampicina (Tribuddharat & Fennewald, 1999), eritromicina (White y col., 2001), estreptomicina (Sandvang, 1999), quinolonas (Mammeri y col., 2005) y hasta betalactámicos (Poirel y col., 2009). También, confieren resistencia a los antisépticos y desinfectantes (Paulsen, 1993). Un integrón puede albergar uno o varios genes *cassette* (Partridge y col., 2009). Como se ha indicado usualmente carecen de promotor, por lo que la eficiencia de la transcripción decrece conforme se alejan de *Pc* (y en su caso de *P2*) (Kaushik y col., 2018). Una excepción a esta regla sería por ejemplo los genes *qnrVC* cuyos genes *cassettes* pueden poseer un promotor propio.

El tamaño de un integrón simple, es decir, sin genes *cassette* incorporados y con los elementos básicos mencionados anteriormente, suele tener un tamaño aproximado de 1,1 kb. (Sabaté & Prats, 2002).

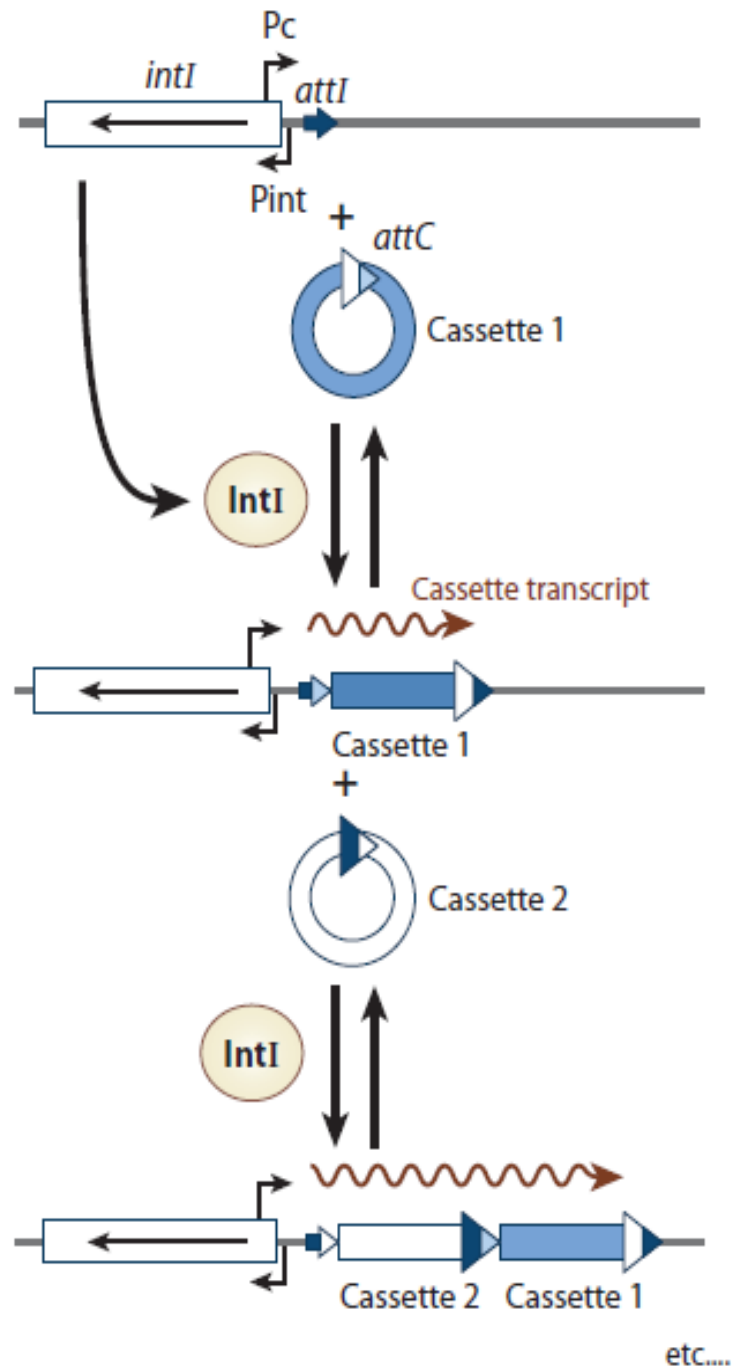


Figura 7. Mecanismos de captura de genes mediada por los integrones y el modelo para el intercambio de cassettes genéticos. *attI*: sitio de recombinación específica de sitio en un integrón río abajo (*downstream*), *Pc*: promotor fuerte en el integrón, *intI*: gen codificante de la integrasa, *IntI*: integrasa, *attC*: sitio de recombinación en el gen *cassette* (Tomado de Cambray y col., 2010).

2.6.2 Clases de integrones.-

Según la secuencia de su integrasa, los integrones se han clasificado en integrones de clase 1, clase 2 y clase 3 (Domingues y col., 2012, Yang y col., 2009).

Integrones de clase 1.

Son detectados con más frecuencia en cepas clínicas. Está constituido por una secuencia conservada 5-SC, a continuación una región variable con genes *cassettes* captados y una zona conservada denominada 3-SC formada por 3 genes: uno que codifica la enzima integrasa (*Int1*), otro de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*) y otro a sulfamidas (*sul1*). Estos dos últimos genes de resistencia no son *cassettes*, sino que se encuentran fijados en el integrón (Figura 8) (Bennett, 1999). No obstante, se han descrito tanto integrones atípicos, que carecen la región 3-SC, como integrones compuestos que poseen una segunda región variable tras el extremo 3-SC, donde incorporan nuevos genes de resistencia que finaliza asimismo en un nuevo extremo 3-SC (Hall & Collis, 1998; Hall, 2012).

El integrón de clase 1 es el más común entre las bacterias clínicas y sigue siendo el foco de numerosos estudios (Barlow y col., 2004). Esta clase de integrones no es auto-móvil y se le ha relacionado directamente con los transposones de tipo Tn402 y con la familia Tn3 (Tn21 o Tn1696) (Recchia & Hall, 1997; Rowe-Magnus & Mazel, 2001).

Se ha estudiado el integrón de clase 1 en diversos microorganismos, entre los que se encuentran bacterias Gram negativas clínicas: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Stenotrophomonas* y *Vibrio* (Stokes y col., 1997; Rowe & Mazel, 2001; Tauch y col., 2002; Ramírez y col., 2005; Crowley y col., 2008; Partridge y col., 2009; Xu y col., 2009). Su incidencia y prevalencia ha sido reportada entre 22 y 59 por ciento. Los integrones de clase 1 no han sido estudiados aún en el Perú en aislados de *E. coli*.

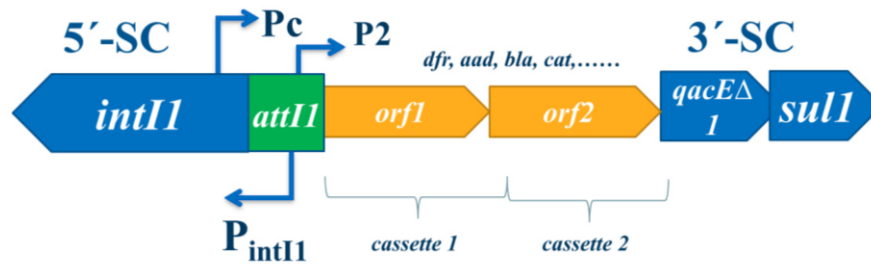


Figura 8. Estructura general de un integrón de Clase 1. 5'-SC: Denominado Segmento conservado 5' (5'-SC), 3'-SC: Segmento conservado 3' (3'-SC), RV: región variable (*cassettes* genéticos), *intI1*: gen de la enzima integrasa de clase 1, Pc y P2: secuencia de promotores de *cassettes* genéticos, *attI1*: secuencia de recombinación, *qacEΔ1*: gen que codifica resistencia a amonio cuaternario, *sul1*: gen que codifica resistencia a sulfonamidas (Tomado de González y col., 2004).

Integrones de clase 2.

Integrón relacionado al transposón de la familia Tn7 y sus derivados, tales como Tn1825, Tn1826 y Tn4132 (Deng y col., 2015). El segmento 5' conservado (5'-SC) consta de un gen *intI2* denominado integrasa de clase 2, a continuación un sitio de recombinación *attI2* y finalmente el promotor Pc (Xu y col., 2009), mientras que su segmento 3' conservado (3'-SC) está conformado por cinco genes *tns* (*tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD*, *tnsE*) que sirven para el movimiento del transposón e integrón de clase 2 a través de una inserción preferencial en un sitio único dentro de los cromosomas bacterianos (Senda y col., 1996; Hansson y col., 2002; Labbate y col., 2009) (Figura 9). Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de las integrasas de tipo 1 y 2, se observó que la *intI2* cuenta con una identidad del 40% con *IntI1* (Recchia y col., 1995). Sin embargo, a pesar de contar con secuencias conservadas, en los últimos años, integrones de clase 2 han presentado nuevas variaciones en *Providencia stuartii* (Barlow & Gobius, 2006) y en *E. coli* (Márquez y col., 2008). Además, han sido comúnmente reportados en algunas especies de organismos Gram negativos como *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*,

Pseudomonas, *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis* con un bajo porcentaje de aparición y prevalencia comparando con los integrones de clase 1 (Clark y col., 1999; Ramírez y col., 2005; Crowley y col., 2008; Machado y col., 2008; Macedo-Viñas y col., 2009; Xu y col., 2009).

La estructura clásica de los *cassettes* genéticos en integrones de la clase 2 incluye la dihidrofolato reductasa (*dfrA1*), la estreptotricina acetiltransferasa (*sat1*) y la aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA1*), que confieren resistencia al trimetoprima, estreptotricina y estreptomina / espectinomicina, respectivamente (Labbate y col., 2009).

Datos locales en referencia a los integrones de tipo 2 y *cassettes* genéticos no han sido reportados aún.



Figura 9. Estructura general de un integrón de Clase 2. Se presenta en colores las regiones conservadas y en blanco las regiones variables. En rojo se marca la región 5' SC (el asterisco en *intI2* * indica que es un pseudogen) y en azul la región 3' SC. Se respetó la región variable presente en el *Tn7*. (Tomado de Di Conza & Gutkind, 2010).

2.7. Integrones en cepas de *E. coli* diarreogénicas y procedentes de pacientes con bacteremia

A nivel mundial, los estudios identificando integrones en *E. coli* diarreogénicas han sido más frecuentes. De esta manera, 96 aislados de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) aisladas de humanos, ganado y alimentos de diferentes serogrupos presentaron una alta resistencia a más de un antibiótico y se identificaron 6% (17) con integrones de clase 1 (Morabito y col., 2002). Otros patotipos de *E. coli* han sido analizados también; entre ellos, 10 cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y 25 enteroagregativa (EAEC) aisladas de pacientes senegaleses resistentes a por lo menos dos antibióticos; y se obtuvo

40% (4) EIEC y 60% (15) EAEC que albergan integrones de clase 1 (Gassama y col., 2004).

E. coli extraintestinales, como las provenientes de sangre, también presentan integrones. Así, en un hospital español durante el año 2007, aislaron 135 cepas de *E. coli* a partir de hemocultivos. De ellas, el 40% (54 cepas) albergaban integrones (Vinué y col., 2010). Zeighami y colaboradores realizaron un estudio en Irán donde analizaron 200 aislados de *E. coli* uropatogénicas (UPEC) y diarreogénicas (DEC). De estos, 96% (192/200) aislados presentaron resistencia por lo menos a un antibiótico. Asimismo, 92.5% de aislados presentaron integrones con diferencias significativas en la presencia de integrones entre las DEC y las UPEC. Así, en DEC el 94% y 8%, presentaron integrasa de clase 1 y 2 respectivamente. En cambio, en las UPEC, el 87% albergaba el gen de la integrasa de clase 1 y 7% tenía el gen de la integrasa de clase 2 (Zeighami y col., 2015).

En nuestro país, Sulca (2010) identificó y caracterizó los integrantes y su asociación con la resistencia antimicrobiana en aislados de *Vibrio spp.* recolectados en ambientes marinos contaminantes en Lima, este trabajo halló solo una integrasa en una cepa de *V. cholerae* L22 (Sulca, 2010). Otro estudio, analizando *E. coli* diarreogénicas provenientes de niños peruanos analizó los mecanismos de resistencia en 154 aislados donde la integrasa de tipo 1 fue la más frecuente (9,1 %), en comparación con la integrasa de tipo 2 (6,4 %) (Mosquito y col, 2010). Sin embargo, no fueron descritos ni caracterizados los *cassettes* genéticos que podrían estar involucrados.

Este estudio provee información novedosa de uno de los principales elementos genéticos móviles que permiten la diseminación de la resistencia antibacteriana, adicionalmente intenta explicar la presencia de cepas multirresistentes, producto de la posible colección de genes que albergan estas plataformas. Conocer esta información permitirá concientizar a la población con respecto al uso racional de antimicrobianos, al personal de salud les permitirá conocer como las bacterias pueden diseminar la resistencia antimicrobiana y a los investigadores les permitirá considerar en futuros estudios el efecto de

estos elementos genéticos en la diseminación. En nuestro país, pocos estudios se han realizado para conocer la presencia de las cepas circulantes con estos elementos móviles y su asociación con la resistencia antibiótica. Por lo tanto, en el presente trabajo se describe la resistencia antimicrobiana y se caracteriza los *cassettes* genéticos que se albergan en cepas de *E. coli* provenientes de niños menores de dos años con diarrea y bacteremia.

III. HIPÓTESIS

Los aislados de *E. coli* de bacteremia y diarrea en niños menores de dos años de Lima presentan integrones asociados a la Resistencia Antimicrobiana.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Identificar y caracterizar los integrones asociados a la resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* provenientes de niños menores de dos años con diarrea y bacteremia de Lima, Perú.

Objetivos Específicos:

- Identificar la presencia del gen de la enzima integrasa de clase 1 y 2 en aislados de *E. coli* provenientes de bacteremia y diarrea.
- Caracterizar las regiones variables (*cassettes* genéticos) que albergan los integrones de clase 1 y 2 en aislados de *E. coli* provenientes de bacteremia y diarrea
- Determinar la resistencia antibiótica en los aislados de *E. coli* provenientes de bacteremia y diarrea que albergan integrones.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Los aislados fueron obtenidos de dos estudios previos realizados en Lima pertenecientes al Laboratorio de Enfermedades Entéricas, Nutrición y Resistencia Antimicrobiana (LEEN-RA) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los especímenes provenientes de diarrea analizados en este estudio se obtuvieron de un ensayo clínico de Lactoferrina para prevención de diarrea. Este fue un estudio de vigilancia activa de diarrea en la comunidad de niños menores de dos años, realizado de enero de 2008 a mayo de 2011 en áreas periurbanas de Lima (Ochoa y col., 2013). Para el presente estudio se lograron reactivar: 129 EPEC, 90 EAEC y 66 ETEC no repetidas y por conveniencia. Mientras que 70 aislados de *E. coli* de pacientes pediátricos con bacteremia fueron recuperados de un segundo estudio (Riveros y col., 2017). Lista de aislados en Anexo 2.

5.1.2 Medios de cultivo y reactivos de biología molecular

Los medios de cultivo y equipos utilizados para el presente trabajo son listados en el Anexo 1.

5.2 Métodos

5.2.1 Reactivación de las cepas

Todos los aislados fueron mantenidos en caldo skim milk con glicerol a -80 °C. La reacción consistió en atemperar a medio ambiente por 20 minutos los aislados y luego sembrarlos en agar Mac Conkey e incubarlos a 37 °C por 24 horas. Estas cepas fueron utilizadas para la extracción de ADN y antibiograma.

5.2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó según el método de “shock térmico”, descrito por Guión y col., 2008 con algunas modificaciones. En 100 µl de agua grado biología molecular se colocaron 5 colonias de *E. coli* crecidas previamente en

agar MacConkey a 37 °C por 24 horas. La suspensión celular se llevó a un termobloque a 100 °C por 5 minutos, para después someterla a temperatura ambiente por 10 minutos, paso seguido, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante, se guardó a -20 °C hasta su uso (Guión y col., 2008).

5.2.3 Detección e identificación de Integrones de clase 1 y clase 2

Con el objetivo de identificar los integrones, se realizó un flujograma de trabajo (Figura 10).

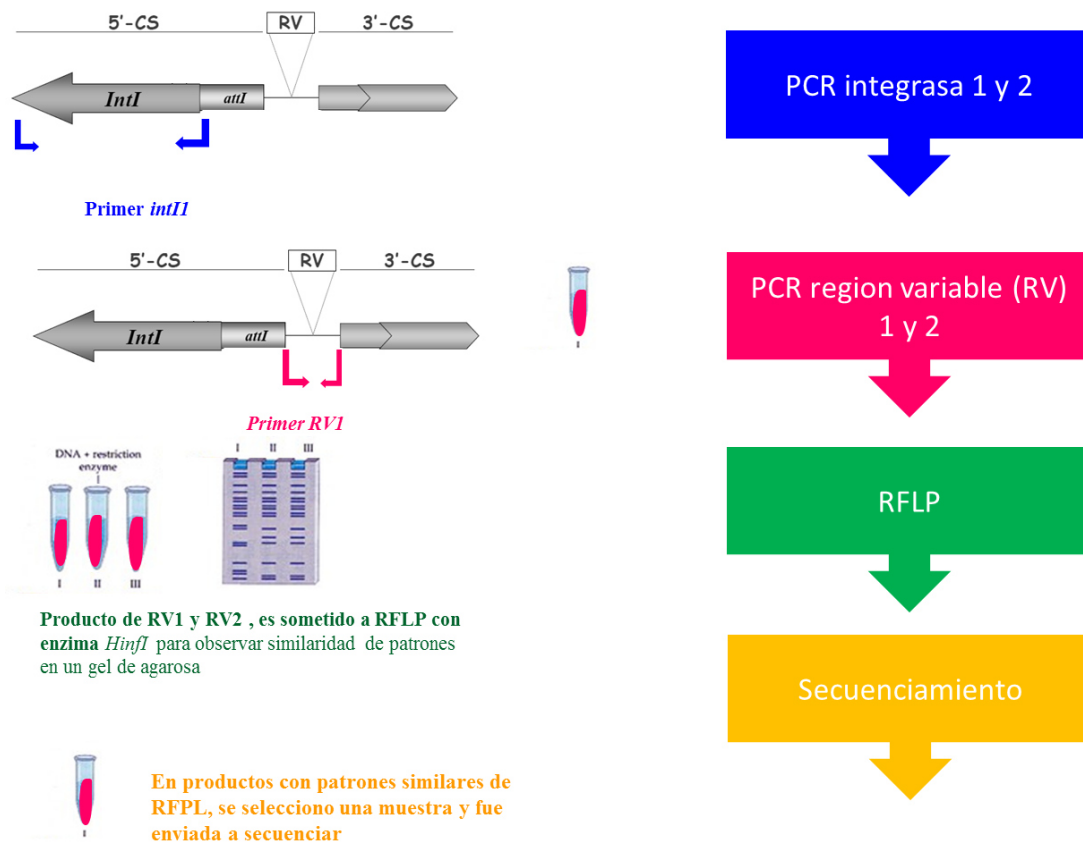


Figura 10. Flujograma de identificación de Integrones de clase 1 y clase 2.

5.2.3.1 Detección de integrasa

Para clasificar si estos aislados contenían integrones de clase 1 y/o 2 para detectar la presencia de los genes *intI1* e *intI2* respectivamente. Para ello se procedió a realizar un la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los cebadores usados se listan en la tabla 3. La reacción de

amplificación de ADN se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que incluía tampón de reacción 1X, dNTP 200µM, MgCl₂ 1,5 mM, cebadores 0,5µM, Taq ADN polimerasa 1 U/ml (Promega®), y ADN molde ~25 ng. Se utilizó un termociclador iCycler (Bio-Rad) teniendo en cuenta las condiciones de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por un minuto, la etapa de hibridación para integrasa 1 fue un minuto a 62°C. Mientras que para la integrasa 2 fue de un minuto a 63°C, en ambas reacciones se continuó con un minuto a 72°C y se culminó con un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de cada reacción fueron revelados en geles de agarosa (Invitrogen®) al 1% a 5 V/cm, las cámaras de electroforesis contenían tampón TBE 0.5X con 0.5µg/ml de bromuro de etidio. Los productos fueron visualizados bajo luz UV y se registraron utilizando un sistema de documentación de gel (Bio-Rad, Hercules, Calif.). Los tamaños de los amplificadores se estimaron con el marcador ADN 100pb ladder (Invitrogen®). Los controles para los genes de *intl1* e *intl2* fueron cepas de la colección interna de ISGLOBAL, de las que se sabía la positividad para ambos genes, mientras que el control negativo fue *E. coli* 25922.

Tabla 3. Cebadores y temperaturas de hibridación para el uso en la reacción de PCR para la detección de integrasas.

Primer	Secuencia (5' →3')	Gen	TP (pb)	TH (°C)	Referencia
Intl1-F	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	<i>intl1</i>	483	62	Mazel y col., 2000
Intl1-R	ACATGGGTGTAAATCATCGTC				
Intl2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	<i>intl2</i>	788	63	Wayne, 2002
Intl2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG				

TP: Tamaño del producto de PCR, TH: Temperatura de hibridación

5.2.3.2 Detección de región Variable 1 (RV1) y Región Variable 2 (RV2)

Los aislados que fueron positivos para la presencia del gen *intl1* y/o *intl2* (integrasa 1 y/o 2) se amplificó la región variable 1 (RV1) y 2 (RV2); la reacción de amplificación de ADN contenía un volumen total de 25 µl que incluía tampón de reacción 1X, dNTP 200µM, MgCl₂ 1,5 mM, cebadores 0,5µM, Taq ADN polimerasa 1 U/ml (Promega®) (Tabla 4), y ADN molde ~25 ng. Todos los tubos conteniendo la reacción fueron colocados en un termociclador iCycler

(Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5 minutos como primer paso de desnaturalización inicial; a continuación 30 ciclos de un minuto a 95°C, seguido de la hibridación con un minuto a 55°C para RV1 y 60°C para RV2, finalmente un minuto a 72°C y como ciclo de extensión final 10 minutos a 72°C. Los productos generados fueron revelados en un gel de agarosa al 1% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio durante una hora en una cámara electroforética conteniendo tampón TBE 0.5X con 100V. Los productos fueron visualizados bajo luz UV y se registraron utilizando un sistema de documentación de gel (Bio-Rad, Hercules, Calif.). Los tamaños de los amplificadores se estimaron con el marcador de ADN de 100pb ladder (Invitrogen®). Los controles para los genes de RV1 y RV2 fueron cepas de la colección interna de ISGLOBAL, de las que se sabía la positividad para ambos genes, mientras que el control negativo fue *E. coli* 25922.

Tabla 4. Cebadores y temperaturas de hibridación para el uso en la reacción de PCR para la detección de Región Variable

Primer	Secuencia (5' →3')	Gen	TP (pb)	TH (°C)	Referencia
Int-F	GGCATCCAAGCAGCAAG	RV1	Variable	55	Levesque & Roy, 1993
Int-R	AAGCAGACTTGACCTGA				
Hep-F	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA	RV2	Variable	60	White y col., 2001
Hep-R	GATGCCATCGCAAGTACGAG				

RV1: Región variable del integrón de clase 1, **RV2:** Región variable del integrón de clase 2.

TP: Tamaño del producto de PCR, **TH:** Temperatura de hibridación

Las regiones RV1 y/o RV2 fueron considerados positivos a la presencia de bandas robustas en los geles de agarosa con tamaños mayores a 700 pb., esas mismas bandas fueron extraídas con ayuda de un bisturí y fueron traspasadas a un microtubo para proceder con el RFLP.

5.2.3.3 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Los amplicones obtenidos de las regiones variables RV1 y/o RV2 fueron purificados de acuerdo al protocolo de Wi-zard® SV Gel Up System (Promega, Madison, USA).

Para el análisis del Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción de los productos de PCR (RFLP-PCR) se realizó la digestión durante 30 minutos con

la enzima *HinfI* (Gibco ®) a 37°C, las digestiones fueron luego reveladas en geles de agarosa a 2% con bromuro de etidio 0.5 µg/ml a 100V en tampón TBE 0.5X. El perfil de bandeo comparado entre todas las muestras permitió clasificar a las regiones variables (RV1 y RV2) portadoras de los mismos *cassettes* genéticos cuando los amplicones presentaban igual patrón de bandeo.

5.2.3.4 Secuenciamiento

Los amplicones de este trabajo fueron enviados a la compañía de biotecnología MacroGen para el secuenciamiento (MacroGen, Seúl, Corea del Sur). Las secuencias fueron comparadas con las secuencias almacenadas en el NCBI mediante el programa informático BLAST (disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La comparación se efectuó según los parámetros estándar recomendados (*expect threshold 10; word size 28; match/mismatch scores 1-2; linear gap cost*).

5.2.4 Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *E. coli* con integrones de clase 1 y 2

La prueba de sensibilidad a los antimicrobianos se desarrolló por el método de disco difusión de acuerdo con la guía CLSI, 2015 (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*). Los aislados de *E. coli* fueron sembrados en agar tripticasa de soya durante 24 horas a 37°C, concluido el tiempo de incubación una colonia se disolvió en un tubo con 3 ml de solución salina, se ajustó la turbidez del inóculo a 0,5 de la escala de Mac Farland por espectrometría. Realizada esta suspensión, se sumergió un hisopo estéril y se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo para remover el exceso de inóculo. Se inoculó en forma de estría en la superficie de la placa de Mueller Hinton, asegurando homogeneidad. Se colocaron los discos conteniendo los siguientes antimicrobianos: ampicilina (AMP, 10µg), trimetoprima/sulfametoxazol o Sulfatrimetoprima (STX, 10µg), tetraciclina (TET, 5µg), cloranfenicol (CLO, 30µg), gentamicina (GEN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 10µg), ácido nalidíxico (NAL, 10µg), nitrofurantoina (NIT, 30µg), aztreonam (AZM, 30µg), ceftazidima (CAZ, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg), amoxicilina-

ácido clavulánico (AMC, 30µg). Se incubaron a 37 °C por 18 horas. Luego, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición usando una regla o calibrador. Se realizó la detección de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) bajo la técnica de doble disco (Jarlier y col., 1988) en aislados con resistencia a cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima y cefotaxima. Así, se colocaron discos distribuidos como se detalla a continuación, un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10µg) en el centro de una placa y a una distancia de 30mm, los discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30µg), ceftriaxona (30µg) y aztreonam (30µg). La presencia de halos de inhibición en forma ampliada producto del efecto sinérgico entre los antibióticos indicó la producción de enzimas BLEE (Figura 11).

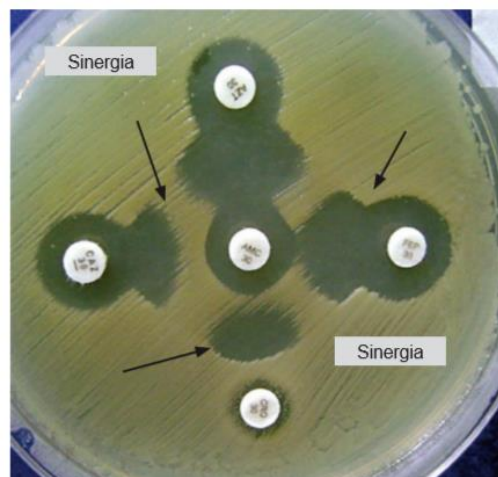


Figura 11. El método de doble disco para la detección de BLEE, discos de ceftriaxona (CRO), ceftazidime (CAZ), aztreonam (AZM), Cefepime (FEP) con el disco central de amoxicilina/ ácido clavulánico (AMC) (Tomado de Lezameta y col., 2010).

5.2.8 Análisis estadísticos

Se usó Microsoft Excel como procesador de datos y para realizar las estadísticas descriptivas. Para comparar frecuencias se usó la prueba exacta de Fisher, un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS

6.1. Detección del gen de la enzima integrasa de clase 1 y 2

Los aislados de *E. coli* fueron interpretados como positivos a integrones de tipo 1 y tipo 2 cuando presentaban una banda con peso molecular de 483pb y 788pb respectivamente (Figuras 12 y 13). Los integrones de tipo 1 predominaron más que los de tipo 2 y la mayor frecuencia se presentó en aislados de *E. coli* provenientes de bacteremia con un 53% (37/70).

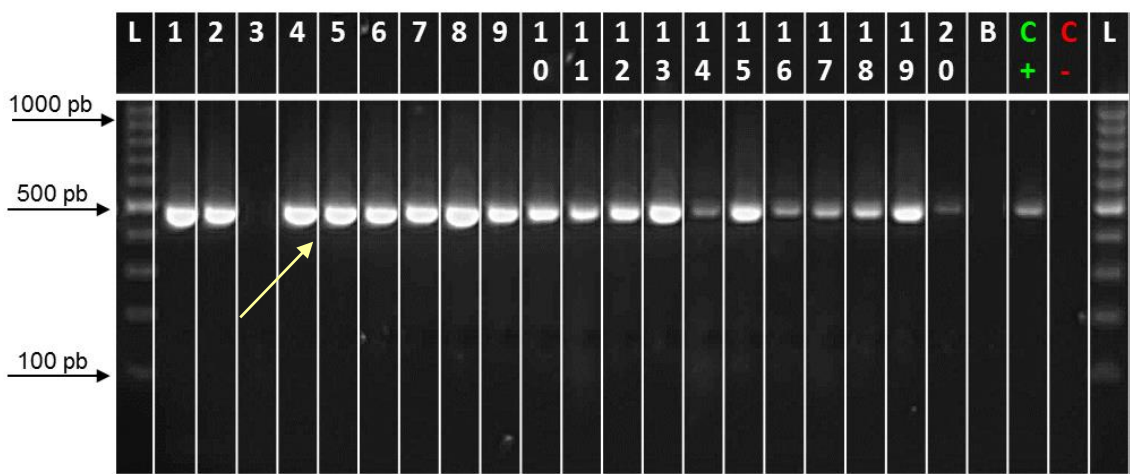


Figura 12. Identificación de integrones de clase 1 en aislados de bacteremia. La flecha amarilla indica una banda de 483pb. L: marcador de 100 pb, C+: control positivo, C-: control negativo y B: blanco.

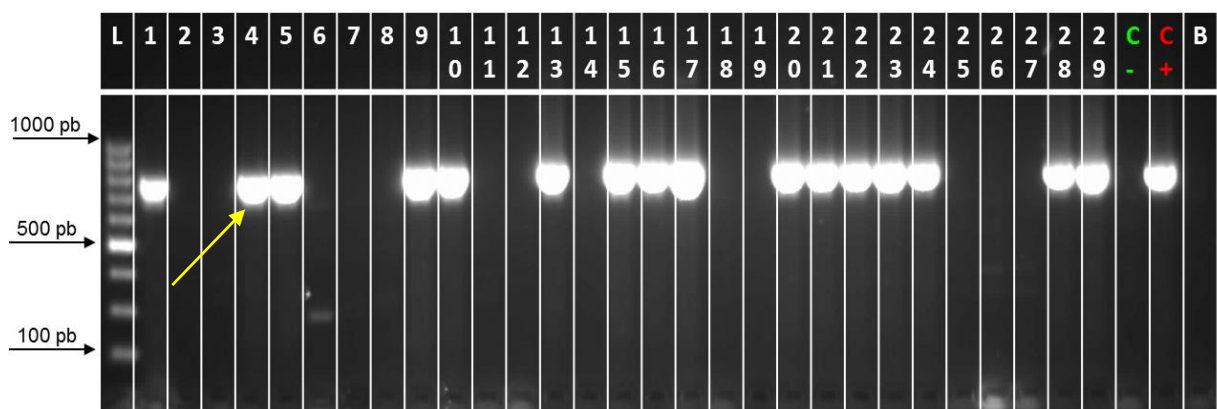


Figura 13. Identificación de integrones de clase 2 en aislados de EPEC. La flecha amarilla indica una banda de 788pb. L: marcador de 100 pb, C+: control positivo, C-: control negativo y B: blanco.

Aislados con solo integrasas de tipo 1 fueron menos frecuentes en DEC con 23% (65/285). Entre los patotipos, los que con más frecuencia albergaban este tipo de integrasa fue EAEC con 30% (27/90), seguido de ETEC con 20% (13/66) y EPEC con 19% (25/129) (Tabla 5).

Se encontró la presencia de sólo integrasa 2 en menor número de cepas de EAEC 6% (5/90), EPEC 5% (7/129) como también en bacteremia que tuvieron 6% (4/70) aislados positivos. Se evidenció la presencia de por lo menos un aislado portador de ambos genes de integrasa, tanto entre los aislados de DEC como los de bacteremia, como también aislados que carecen de la enzima integrasa de clase 1 y/o 2, en aislados de DEC con 71% (202/285) y aislados de bacteremia con 47% (35/70).

Tabla 5. Frecuencia de integrasas de Clase 1 y 2 de *E. coli* provenientes de sangre y de diarrea en niños menores de dos años

Aislados	Integrasa 1 n (%)	Integrasa 2 n (%)	Integrasa 1 y 2 n (%)	Total n (%)
DEC (n=285)	65 (23)	12 (4)	6 (2)	83 (29)
EAEC (n=90)	27 (30)	5 (6)	2 (2)	34 (38)
ETEC (n=66)	13 (20)	0(0)	1 (2)	14 (21)
EPEC (n=129)	25 (19)	7 (5)	3 (2)	35 (27)
Bacteremia (n=70)	32 (46)	4 (6)	1 (1)	37 (53)*

* $p \leq 0.05$ para la comparación de integrasa 1 entre DEC y bacteremia.

6.2 Detección de región variable 1 (RV1) y región variable 2 (RV2)

Los aislados fueron interpretados como positivos a la RV1 y/o RV2 cuando presentaron una banda robusta con peso molecular por encima de 700pb (Figura 14). En general, la frecuencia de las regiones RV1 y RV2 fue mayor en las muestras procedentes de bacteremia. El 31% (22/70) de *E. coli* provenientes de sangre presentaron la RV1, mientras que entre las DEC con solo RV1, EAEC presentó 24% (22/90), EPEC con 9% (11/129) y ETEC con 6% (4/66).

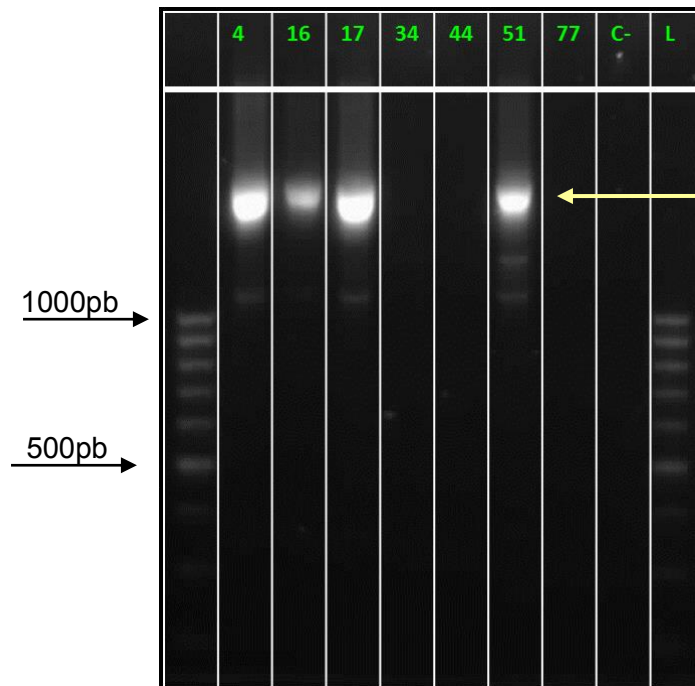


Figura 14. Identificación de RV-2 en aislados de EAEC. L: marcador de 100pb, C-: control negativo. La flecha amarilla indica banda robusta con peso molecular por encima de 700pb indicando RV2 en aislados de EAEC.

Los porcentajes de RV2 fueron similares tanto en *E. coli* de bacteremia 6% (4/70), como DEC en los patotipos EPEC 4% (5/129) y EAEC 3% (3/90). Aislados albergando ambas RV fueron encontrados con menor frecuencia, sin embargo, entre las DEC, EPEC 2% (3/129) tuvo más aislados, mientras que EAEC y ETEC presentaron solo un aislado, en el caso de bacteremia no se encontraron aislados albergando las dos RV.

Los amplicones de RV1 y RV2 que variaron entre 0,1 y 0,7 Kb fueron considerados integrones vacíos teniendo en RV1, EAEC 7% (6/90), ETEC 14% (9/66), EPEC 11% (14/129) y bacteremia 16% (11/70). Para la RV-2, EAEC 3% (3/90), EPEC 2% (2/129) y bacteremia 16% (11/70).

6.3 RFLP de regiones RV1 y RV2

Se observaron 16 patrones diferentes de bandeo en los aislados sometidos a la enzima *Hinfl* (Gibco®) (Figura 15).

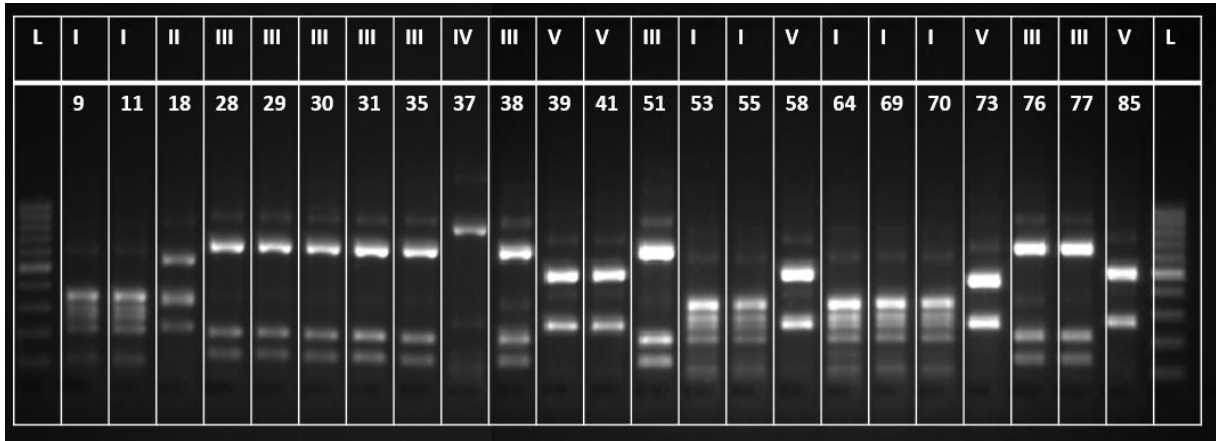


Figura 15. RFLP de región RV1 de EAEC. L: marcador de 100pb. I, II, III, IV, V: Patrones de bandeos obtenidos.

Los integrones de clase 1 y 2 presentaron 12 y 4 patrones diferentes respectivamente. El patrón III estuvo presente en por lo menos uno de los patotipos diarrogénicos y de bacteremia (Tabla 6). Finalmente los amplicones de RV1 y/o RV2 con patrones de RFLP diferentes fueron mandados a secuenciar tomando el producto de PCR original.

Tabla 6. Patrones de RFLP de integrones de clase 1 y 2 de *E. coli* provenientes de sangre y de diarrea en niños menores de dos años

Patotipos	Integrones de clase 1	Integrones de clase 2
EAEC	I (9), II(7), III(5), IV(1),V(1)	XIII (4)
ETEC	III(1), V(1), VI(3)	XIV (1)
EPEC	II(1), III(1), VII(7), VIII(4), IX(1)	VIII(4), XV(4)
Bacteremia	I(2), III(1), IX(1), X(13), XI(1), XII(4)	XVI(4)

EAEC: *E. coli* enteroagregativa, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EPEC: *E. coli* enteropatogénica, I-XVI: patrones de RFLP, 1-5, 7, 9, 13: número de aislados.

6.4 Identificación de *cassettes* genéticos en *E. coli*

Las secuencias que fueron trabajadas en este informe fueron recibidas a nuestro correo donde se incluyó un archivo PDF conteniendo la imagen del cromatograma (Figura 16). Los formatos FASTA de estas secuencias fueron ingresadas al programa CLUSTAL OMEGA (1.2.4) confirmando la unión en varios puntos del alineamiento (Figura 17). El programa en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) reportó un porcentaje de identidad de 97.23% y el valor E del alineamiento menor a 0.01, al observar la secuencia de codificación completa (CDS) pudimos corroborar que la secuencia estudiada proveniente de un aislado de bacteremia albergando un integron de clase 1, tuvo un alineamiento con la cepa *Escherichia coli* NF711859 con integrasa de clase 1 que alberga los genes de resistencia *dfrA17* y *aadA5* que codifican las enzimas dihidrofolato reductasa y aminoglucósido adenililtransferasa que confieren resistencia a sulfatrimetoprima y aminoglucósidos respectivamente (Figura 18). Finalmente, las evidencias nos confirman que la secuencia analizada es un *cassete* de resistencia en este aislamiento. Los 15 genes fueron analizados bajo el mismo procedimiento logrando identificar en total quince *cassettes* genéticos diferentes (Tablas 7 y 8).

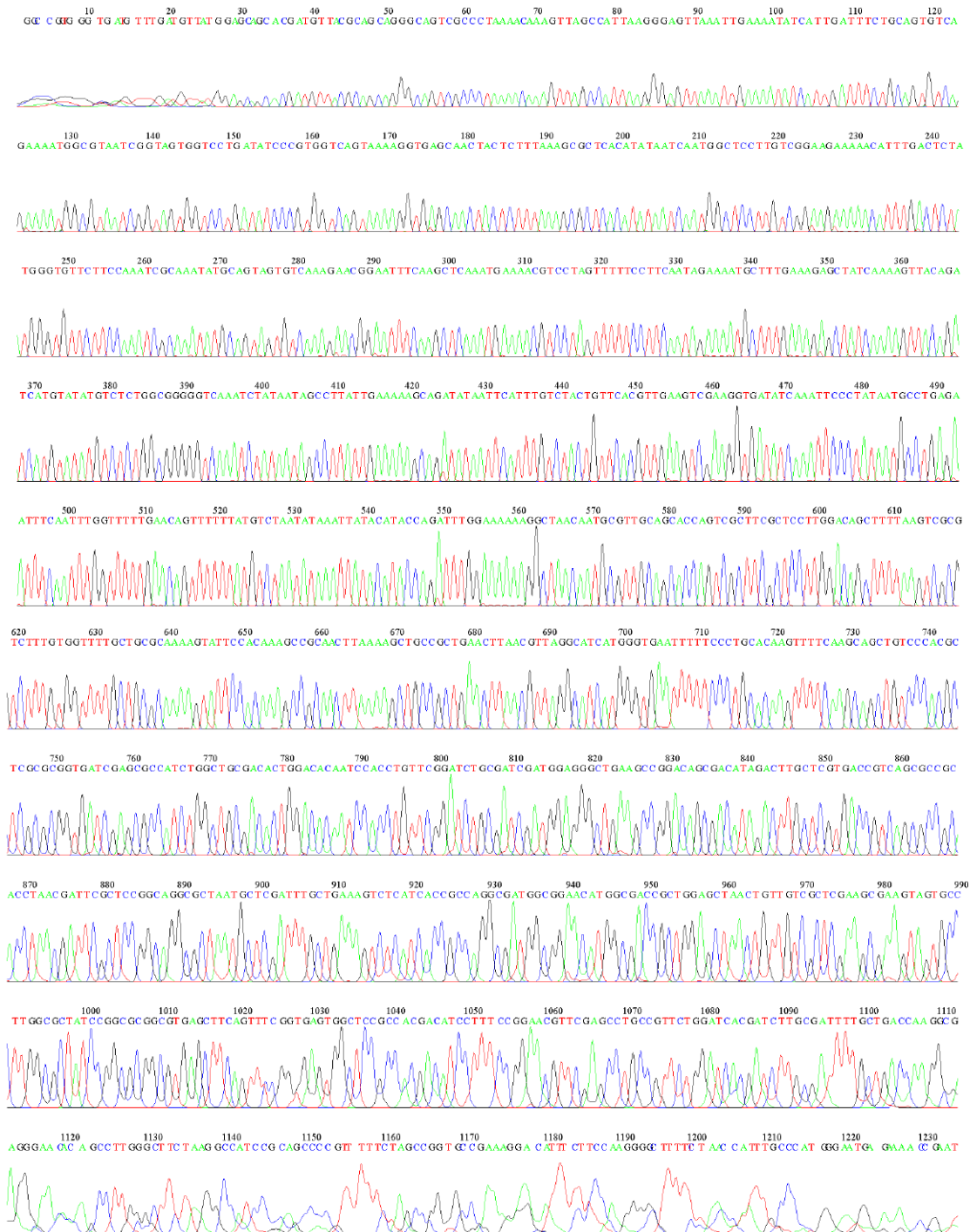


Figura 16. Secuenciamiento de los genes de resistencia *dfrA17* y *aadA5* de aislados de Bacteremia que codifican las enzimas dihidrofolato reductasa y aminoglucósido adenililtransferasa que confieren resistencia a sulfatrimetoprima y aminoglucósidos respectivamente.


```

*****
F ----- 1054
R GCGAGGCAACACAGCCTTGCCTTCTAGGCCCATCCGCAGCCACGTTTTTCGAGCCGGTG 1255

F ----- 1054
R CCGAAGGAGCATTCTCCAAGGCGCTTTCGACACTATGCCAGTGGGAATGCAGAGTCG 1315

F ----- 1054
R GATTGGAAGGGTGACGAGCGGAACGTCGTTCTTGCTCTTGCTCGCATTGGTACAGCGCT 1375

F ----- 1054
R TCAACTGGTCTCATTGCTCCTAAGGACGTTGCTGCCGATGGGTATCGGAGCGTTGCCT 1435

F ----- 1054
R GCCGAGCATCGGCCCTCATCTGCAAGGCACGCGCGCGTACCTGGGTAGCGAGGACGAC 1495

F ----- 1054
R GACCTAGCAATGCGCGTCGAAGAGACGGCCGCGTTCGTTTCGATATGCCAAAGCAACGATT 1555

F ----- 1054
R GAGAGAATCTTGCGTTGAGCGGCATGTGCGAAAAGTGCATCGACCCGCGCCGAGGGCATC 1615

F ----- 1054
R TGATGCCTAACTCGGCGTTCAAGCGGACGGGCTGCGCCCGCGCTCAACTATGCGTTAGA 1675

F ----- 1054
R TGCACTAAGCACATATGTATACCCC 1700

```

Figura 17. Alineamiento de secuencia múltiple de los genes de resistencia *dfrA17* y *aadA5* de aislados de Bacteremia haciendo uso del programa CLUSTAL OMEGA (1.2.4).

*puntos de alineamiento

Escherichia coli strain NF711859 class I integron dihydrofolate reductase (dfrA17) and aminoglycoside adenyltransferase (aadA5) genes, complete cds

GenBank: HQ880278.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

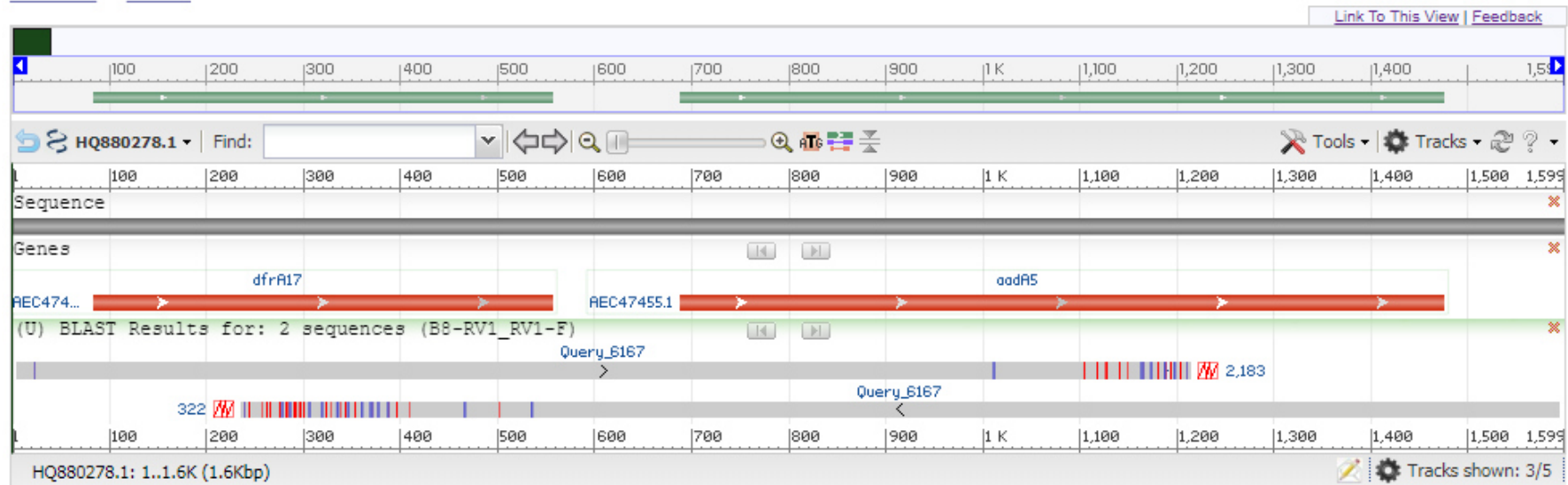


Figura 18. Grafica de la secuencia de codificación completa (CDS) de los genes de resistencia *dfrA17* y *aadA5* de aislados de Bacteremia. La imagen revela el alineamiento con la cepa *Escherichia coli* NF711859 con integrasa de clase 1 que alberga los genes de resistencia *dfrA17* y *aadA5*.

Los *cassettes* genéticos presentados en estos aislados presentaron entre 700 pb y 1800 pares de bases (pb) como también integrones vacíos con bandas de 200 a 300. Los integrones de clase 1 más comunes fueron los amplicones de 700 pares de bases y 1500 pares de bases, mientras que en la clase 2, los amplicones de 1500 pares de bases fueron los más frecuentes.

En total quince diferentes *cassettes* genéticos estuvieron presentes en estos aislados. Este trabajo reporto los genes *aadA1*, *aadA2*, *aadA5* que confieren resistencia a los aminoglucósidos y que codifican diferentes variantes de aminoglucósido adeniltransferasa A (*aadA*), el gen de resistencia a gentamicina / tobramicina / kanamicina (*aadB*) y los genes de *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17* que codifican variantes de la dihidrofolato reductasa A (*dfrA*) que confieren resistencia a trimetoprima. Adicionalmente se detectó la presencia de genes *catB3* confiriendo resistencia a cloranfenicol y 1 ORF (marco de lectura abierta).

Los aislados portadores de integrasa 1, presentaron doce genes, los genes *catB3*, *aadB*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17* y 1 ORF (marco de lectura abierta) (Tabla 7).

En integrones de clase 2 se identificaron 5 genes, *dfrA1*, *aadA1* anteriormente mencionados y otros 3 genes *cassettes* diferentes (*sat 1*, *2* y *3*) que confieren la resistencia a la estreptotricina y que estuvieron una relación particular en EAEC con *sat 2*, ETEC y EPEC con *sat 1* y Bacteremia con *sat3*. (Tabla 8).

Con estos datos, se consideró un número nuevo de aislados que confirmaron la presencia de los integrones (Tabla 9).

Tabla 7. Propiedades y contenido de integrones de clase 1 y genes cassette en aislados de *E. coli* provenientes de DEC y bacteremia.

Patotipo	N	tipo RFLP	Resistencia Antibiótica	TA (kb)	gen cassette
EAEC (n=23)	2	I	AMP, CLO	1	<i>aadA1</i>
	1	I	AMP, STX	1	<i>aadA1</i>
	3	I	TET, STX	1	<i>aadA1</i>
	1	II	STX, TET, NAL	1.5	<i>dfrA1,aadA1</i>
	3	II	AMP, STX, TET, CLO	1.5	<i>dfrA1,aadA1</i>
	1	III	AMP, STX, NAL, CLO	0.8	<i>dfrA7</i>
	1	IV	AMP, STX, TET, NAL, CLO	1.5	<i>aadB,catB3</i>
	1	III	AMP, STX, TET, NAL, CLO	0.8	<i>dfrA7</i>
	1	II	AMP, STX, TET, NAL, CLO	1.5	<i>dfrA1,aadA1</i>
	1	V	AMP, STX, TET, NAL, AZM	1.8	<i>dfrA12,orfF,aadA2</i>
	1	I	AMP, STX, TET, NAL, AZM	1	<i>aadA1</i>
	1	I	AMP, STX, TET, CLO, AZM	1	<i>aadA1</i>
	1*	I	AMP, STX, TET, NAL, CLO, AMC	1	<i>aadA1</i>
	1	II	ND	1.5	<i>dfrA1,aadA1</i>
	1	III	ND	0.8	<i>dfrA7</i>
	1	II	ND	1.5	<i>dfrA1,aadA1</i>
2	III	ND	0.8	<i>dfrA7</i>	
ETEC (n=5)	1	III	AMP, STX	0.8	<i>dfrA7</i>
	3	VI	AMP, STX,TET	0.8	<i>dfrA5</i>
	1*	V	AMP, STX,TET, NAL	1.8	<i>dfrA12,orfF,aadA2</i>
EPEC (n=14)	1	VII	NAL	0.8	<i>dfrA1</i>
	1	VII	STX, CLO	0.8	<i>dfrA1</i>
	1	VII	AMP, STX, TET	1.5	<i>dfrA7,aadA5</i>
	1	III	AMP, STX, AZM	0.8	<i>dfrA7</i>
	1*	VII	AMP, CTX, AZM	0.8	<i>dfrA1</i>
	1	VII	AMP, STX,TET, AZM	0.8	<i>dfrA1</i>
	1	II	AMP, STX,TET, AZM	1.5	<i>dfrA1,aadA1</i>
	1	VIII	AMP, STX, TET, CLO	1.5	<i>dfrA7,aadA5</i>
	1*	VIII	AMP, STX, TET, NAL	1.5	<i>dfrA7,aadA5</i>
	1	VIII	AMP, STX, NAL, CTX	1.5	<i>dfrA7,aadA5</i>
	1*	VII	AMP, STX, TET, NAL, CLO, AMC	0.8	<i>dfrA1</i>
	1	VII	AMP, STX, TET, NAL, CLO, CTX	0.8	<i>dfrA1</i>
1	IX	ND	1.5	<i>dfrA15,aadA1</i>	
1	VIII	ND	1.5	<i>dfrA7,aadA5</i>	
Bacteremia (n=22)	1	X	STX	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	1	XII	AMP, GEN	1.8	<i>dfrA12,orfF,aadA2</i>
	1	XII	AMP, STX	1.8	<i>dfrA12,orfF,aadA2</i>
	1	X	AMP, STX	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	1	III	AMP, STX, TET	0.8	<i>dfrA7</i>
	1	XII	AMP, STX, TET	1.8	<i>dfrA12,orfF,aadA2</i>
	1	IX	AMP, STX, TET	1.5	<i>dfrA15,aadA1</i>
	1	X	AMP, STX, CLO	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	2	X	AMP,STX,CF3**	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	1	XI	AMP, STX, TET, CF3**	1.3	<i>aadB,aadA2</i>
	1	X	STX, TET, CLO, GEN, NIT	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	1	I	AMP, NAL, GEN, CF3**	1	<i>aadA1</i>
	1	X	AMP, TET, NAL, CIP, CF3**	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	2	X	AMP, STX, TET, NAL, CF3**	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	1	I	AMP,STX, NAL, CLO, CIP, CF3**	1	<i>aadA1</i>
	2	X	AMP, STX, TET, NAL, GEN, CF3**	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	1	X	AMP, STX, TET, NAL, GEN, CIP, CF3**	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>
	1	XII	AMP, STX, TET, NAL, GEN, CIP, CF3**	1.8	<i>dfrA12,orfF,aadA2</i>
1	X	AMP, STX, TET, NAL, CLO, GEN, CIP, CF3**	1.5	<i>dfrA17,aadA5</i>	

* Aislado albergando integrones de clase 1 y 2.

** Cepas BLEE positivas

N: número de aislados, TA: tamaño del amplicón, CF3: cefalosporina de tercera generación, STX: sulfatrimetoprima, TET: tetraciclina, CTX: cefotaxima, AZM: aztreonam, NAL: ácido nalidixico, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, NIT: nitrofurantoina.

Tabla 8. Propiedades y contenido de integrones y genes *cassette* de clase 2 en aislados de *E. coli* provenientes de DEC y bacteremia.

Patotipo	N	tipo RFLP	Resistencia Antibiótica	TA (kb)	gen <i>cassette</i>
EAEC (n=4)	1	XIII	STX, TET, CLO	1.4	<i>dfrA1,sat2</i>
	1	XIII	AMP, TET, CLO	1.4	<i>dfrA1,sat2</i>
	1	XIII	AMP, STX, TET, CLO	1.4	<i>dfrA1,sat2</i>
	1*	XIII	AMP, STX, TET, NAL, CLO, AMC	1.4	<i>dfrA1,sat2</i>
ETEC (n=1)	1*	XIV	AMP, STX, TET, NAL	1.5	<i>sat2,aadA1</i>
EPEC (n=8)	1	XV	STX, TET	1.5	<i>aadA1,sat1</i>
	1	VIII	AMP, TET, NAL	1	<i>dfrA1</i>
	1*	VIII	AMP, CTX, AZM	1	<i>dfrA1</i>
	1*	XV	AMP, STX, TET, NAL	1.5	<i>aadA1,sat1</i>
	1	XV	AMP, STX, TET, NAL, CLO	1.5	<i>aadA1,sat1</i>
	1*	VIII	AMP, STX, TET, NAL, CLO, AMC	1	<i>dfrA1</i>
	1	VIII	AMP, STX, TET, NAL, CLO, AMC	1	<i>dfrA1</i>
	1	XV	ND	1.5	<i>aadA1,sat1</i>
Bacteremia (n=4)	1	XVI	AMP, STX, TET, NAL, CIP	1.5	<i>dfrA1,sat3</i>
	2	XVI	AMP, STX, TET, NAL, CLO, CIP	1.5	<i>dfrA1,sat3</i>
	1	XVI	AMP, STX, TET, NAL, GEN, CF3**	1.5	<i>dfrA1,sat3</i>

* Aislado albergando integrones de clase 1 y 2

** Cepas BLEE positivas

N: Número de aislados, TA: tamaño del amplicón, CF3: cefalosporina de tercera generación, STX: sulfatrimetoprima, TET: tetraciclina, CTX: cefotaxima, AZM: aztreonam, NAL: ácido nalidixico, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol.

Tabla 9. Frecuencia de integrones de clase 1 y 2 en aislados de *E. coli* provenientes de sangre y de diarrea en niños menores de dos años

Aislados	Integron 1 n (%)	Integron 2 n (%)	Integrones 1 y 2 n (%)	Total n (%)
DEC (n=285)	37 (13)	8 (3)	5 (2)	50 (18)
EAEC (n=90)	22 (24)	3 (3)	1 (2)	26 (29)
ETEC (n=66)	4 (6)	0 (0)	1 (2)	5(8)
EPEC (n=129)	11 (9)	5 (4)	3 (2)	19 (15)
Bacteremia (n=70)	22 (31)*	4 (6)	0 (0)	26 (37)

* $p \leq 0.0002$ para la comparación de integrones de clase 1 entre DEC y bacteremia. Los integrones vacíos no se contabilizaron.

6.5 Resistencia antibiótica en los aislados de *E. coli* diarreogénicas y bacteremia que albergan integrones.

Para este análisis no se pudieron recuperar todos los aislados de DEC que albergaban integrones, por lo tanto el número de muestras varió en los patotipos: EAEC 18 de 23, EPEC 12 de 23, 5 ETEC y 14 de 22 aislados de bacteremia. En general se observó una alta resistencia a ampicilina, sulfatrimetoprima y tetraciclina tanto en DEC como en bacteremia. Los aislados de DEC con integrones de tipo 1 presentaron una alta resistencia a sulfatrimetoprima en EAEC (89%) y EPEC (83%), resistencia a tetraciclina en EAEC (78%) y EPEC (58%), como también a AMP en EAEC (78%) y EPEC (83%), pero fueron sensibles a ciprofloxacino y gentamicina (Figura 20); los 5 aislados de ETEC *st* albergaron integrones de clase 1, presentaron resistencia en su mayoría a ampicilina, sulfatrimetoprima y tetraciclina. Por otra parte, las cepas de *E. coli* provenientes de sangre exhibieron altos niveles de resistencia a ampicilina (91%), sulfatrimetoprima (86%), tetraciclina (68%). Los aislados con integrones de tipo 1 con una frecuencia de 59% (13/33) fueron portadores de β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) según la prueba de doble disco (Tabla 7) (Figura 19), mientras que solo un aislado con integrones de clase 2 presentó BLEE (Tabla 7).

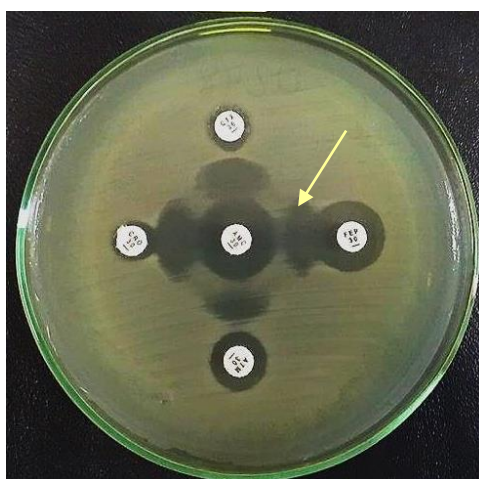


Figura 19. Prueba de doble disco positiva para BLEE. Flecha amarilla señala la sinergia entre los discos de ceftriaxona (CRO), ceftazidime (CAZ), aztreonam (AZM), cefepime (FEP) con el disco central de amoxicilina/ ácido clavulánico (AMC).

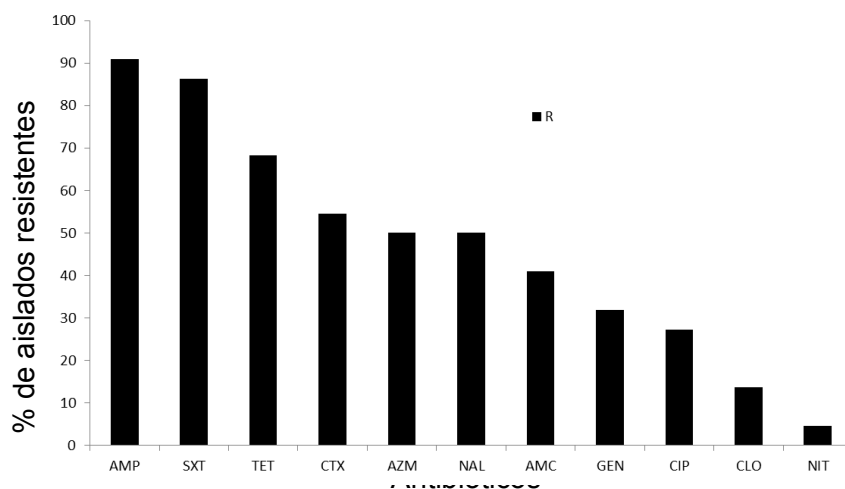
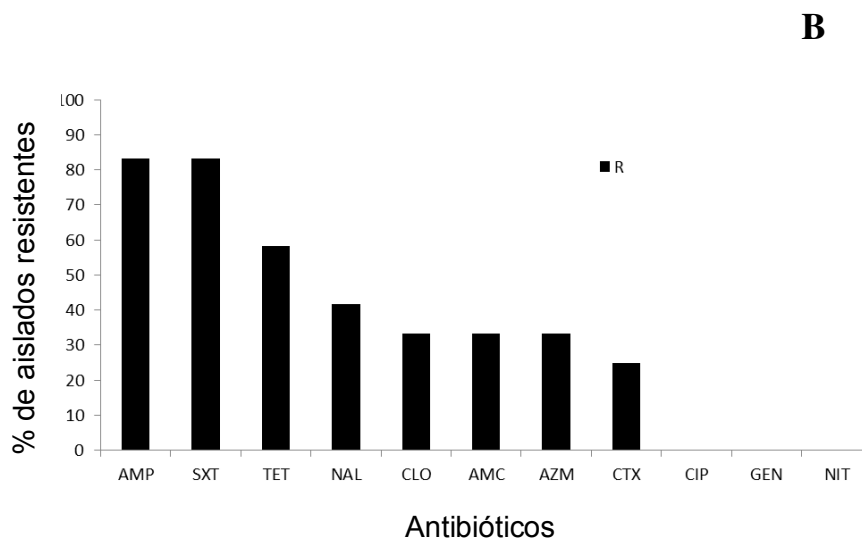
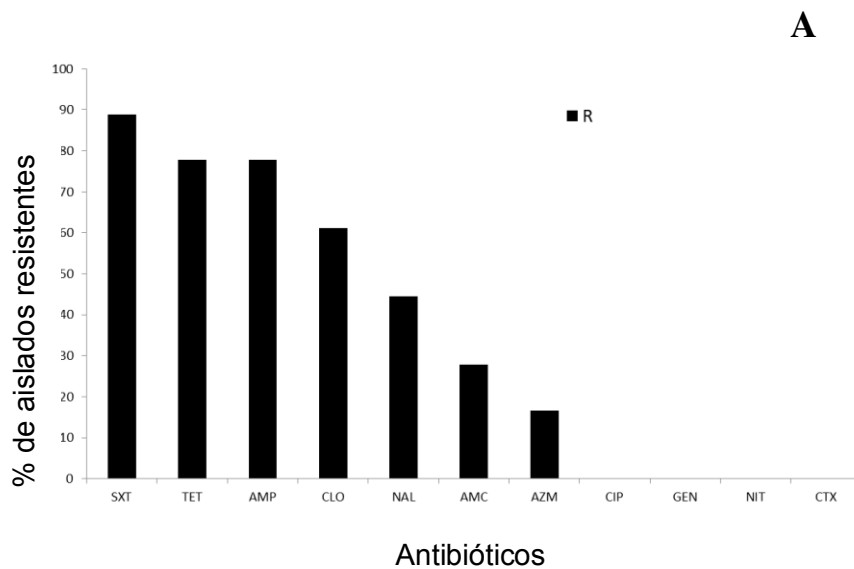


Figura 20. Patrones de resistencia en aislados de *Escherichia coli* diarrogénicas y de bacteremia. A) EAEC, B)EPEC, C) Bacteremia. AMP: ampicilina; STX: sulfatrimetoprima, TET: tetraciclina, CTX: cefotaxima, AZM: aztreonam, NAL: ácido nalidíxico, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, NIT: nitrofurantoina. R: resistencia.

VII. DISCUSIÓN

Los integrones desempeñan un papel importante en la difusión de la resistencia a los antimicrobianos a través de la transmisión horizontal de genes de resistencia; se ha demostrado su contribución a la prevalencia de bacterias Gram negativas con resistencia a múltiples fármacos (Eslami y col., 2010; Kaushik y col., 2018). Este estudio, analizó exhaustivamente los *cassettes* genéticos de integrones de clase 1 y 2 e incluso aislados albergando ambos genes provenientes de aislados de *E. coli* de niños menores de un año con bacteremia y diarrea. Se demostró que la frecuencia de integrones de clase 1 fue mucho más alta que los integrones de clase 2 tanto en aislados de bacteremia como diarreogénicos. En detalle, integrones de clase 1 fueron significativamente ($p \leq 0.05$) más frecuentes en los aislados de *E. coli* provenientes de bacteremia con un 37% (26/70) en comparación con DEC (18%), lo cual difiere con la investigación de Zeighami y col. (2015), quienes encontraron que los aislados de DEC albergaban integrones de clase 1 (94%; 94/100) y de clase 2 (8%; 8/100) en mayor proporción que otras *E. coli* extraintestinales como son *E. coli* uropatógenicas, donde la presencia de integrones de clase 1 (87%; 87/100) y clase 2 (7%; 7/100) fue ligeramente menor. Otros estudios revelan la elevada presencia de integrones de clase 1 en comparación con la clase 2 (Machado y col., 2005; Yan y col. 2010; Xia y col., 2016). Esta diferencia puede deberse a que los integrones de clase 1 se encuentran principalmente en plásmidos conjugativos, lo cual facilita su diseminación (Kang y col., 2005).

En contraste, *E. coli* provenientes de bacteremia presentaron integrones de clase 1 y 2 con 31% (22/70) y 6% (4/70) respectivamente; porcentajes similares fueron reportados en España donde 54/135 (40%) aislados de *E. coli* provenientes de hemocultivos contenían el gen *intI1* que se detectó en 52 aislados (38,5%), *intI2* en 1 aislado (0,7%) y ambos genes *intI1* y *intI2* en un adicional (0,7%) (Vinué y col., 2010). Esta diferencia en la prevalencia de integrones puede deberse a los aislados de *E. coli* analizados, a la población de pacientes, al tipo de especímenes y a la región geográfica.

Los patotipos de DEC con integrones solo de clase 1, EAEC fue el patotipo con mayor frecuencia 24% (22/90), seguido de EPEC con 9% (11/129)

y ETEC con 6% (4/66), mientras que la presencia de solo integrasa de clase 2 se presentó en menor frecuencia tanto en las EAEC 3% (3/90) y EPEC 4% (5/129), similar a las cepas de bacteremia que tuvieron 6% (4/70) de aislados. Estudios realizados en pacientes de Senegal, han evidenciado la presencia de integrones de tipo 1 en EIEC y EAEC (Gassama y col., 2004). De igual manera, en niños menores de 5 años de edad con diarrea en Irán, se reportó un 82% (23/28) de integrones de clase 1 en EPEC (Najibi y col., 2012). Datos similares se obtuvieron en la India, en casos de diarrea por EPEC donde integrones de clase 1 y 2 presentaron una frecuencia de 82% (64/80), integrones de clase 1 en 43 aislados y de clase 2 en 12 aislados y 9 aislados con coexistencia, mientras que en este mismo estudio los controles sanos albergaban integrones de clase 1 en 11 y de clase 2 en 5 aislados con coexistencia de ambos en 3 aislados.

La presencia de integrones en EPEC atípicas (aEPEC) en niños menores de 5 años con y sin diarrea en Iran evidenció que 22 aEPEC (31.4%) albergaban integrones de clase 1 (Shahcheraghi y col., 2014). En el grupo de *E. coli* extraintestinales encontramos que 135 aislados de *E. coli* recuperados de hemocultivos en un hospital español durante 2007 presentaron los integrones de clase 1 y 2 en 54 aislados (*int11*, 52 aislados; *int12*, 1 aislado; y *int11 + int12*, 1 aislado) (Vinué y col., 2008). Estos aislados también presentaron la existencia de cepas albergando ambos genes, siendo así en DEC, EAEC y ETEC con un aislado y EPEC con 3 aislados, mientras que los aislados de bacteremia no presentaron aislado alguno con esta coexistencia.

Estos resultados sugieren que *E. coli* presenta una evolución particular, de manera que pueden combinar varios factores de virulencia permitiendo inducir diferentes enfermedades y ser resistentes a muchas drogas. De hecho, una gran evidencia es el brote EAEC / EHEC con cepas portadoras de genes de resistencia antibiótica tipo CTX-M15 y TEM-1 en Alemania, que pone de relieve la enorme plasticidad del genoma de *E. coli* y que conduce a la aparición de una cepa altamente virulenta y multirresistente (Navarro-García, 2015).

Para poder describir la existencia de *cassettes* genéticos, se evaluó la presencia de la Región Variable 1 (RV1) y Región Variable 2 (RV2) en integrones de clase 1 y 2 respectivamente. En general la frecuencia de RV1 y RV2 fue mayor en bacteremia. En algunos casos, aislados con el gen de integrasa 1 y 2 no presentaron amplicones cuando la PCR de la región variable se realizó de forma repetida, teniendo para el integrón de clase 1, 6 EAEC, 9 ETEC, 13 EPEC y 11 aislados de bacteremia, mientras que en aislados positivos para integrón clase 2 fueron 3 EAEC, 2 EPEC y un aislado de bacteremia. Los resultados negativos pueden deberse a que el sitio de hibridación para el cebador 3'-SC esté ausente y estemos ante integrones atípicos (Zhu y col., 2011), adicionalmente la existencia de reordenamientos o ausencia de sitios de hibridación podrían justificar este fenómeno (Sunde, 2005), como también, aunque más improbable, la presencia de una secuencia de inserción o transposón en medio de la RV1, que en ocasiones puede incluso afectar a la presencia de la región 5'SC, puede resultar en una región de ADN demasiado grande para poder ser amplificada por medio de una PCR convencional (Pérez-Moreno y col., 2012).

Para determinar si los integrones variaron en contenido de genes, los productos de las regiones variables se analizaron por la técnica de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima *HinfI* (Gibco®). Se obtuvieron en total dieciséis patrones diferentes de bandeo y fueron los integrones de clase 1 los que presentaron más patrones, mientras que el patrón III estuvo presente en por lo menos uno de los patotipos diarrogénicos y de bacteremia. Esta técnica es actualmente referida en cuanto a herramientas de la genómica para el estudio de la resistencia bacteriana (Garza-Ramos y col., 2009) y es utilizada en muchos estudios para la caracterización de integrones (White y col., 2001), incluso ya se ha reportado para la diferenciación de integrones de clase 1 y 2 (Japoni y col., 2008; Malek, M. y col., 2015), en aislados de *E. coli* con resistencia a ciprofloxacino (Mooij y col., 2005) y otras bacterias como aislados de *Klebsiella* resistentes a múltiples fármacos en muestras clínicas (Haddadi y col. 2019) reduciendo el costo y tiempo para la identificación de integrones.

Todos los patotipos DEC presentaron genes *aadA*, Yang y colaboradores (2009) obtuvieron los mismos genes *aadA1*, *aadA2*, *aadA5* en pacientes adultos no hospitalizados (Yang y col., 2009). Diferentes estudios han reportado con alta frecuencia el gen *aadA1* en *E. coli* provenientes de heces y fue considerado el *cassette* de clase 1 más común (Odetoyin y col., 2017). Kang y colaboradores (2005) reportaron además que este gen fue encontrado en cerdos, mientras que *aadA2* y *aadA5* fueron identificados dentro de *cassettes* genéticos como *dfrA17-aadA5* y *dfrA12-orfF-aadA2* hallados con mayor frecuencia en *E. coli* proveniente de humanos y aves (Kang y col., 2005), lo cual contrasta de manera interesante con este estudio que ubicó ambos *cassettes* en *E. coli* proveniente de bacteremia, siendo *dfrA17-aadA5* el más frecuente; cabe mencionar, además, que este *cassette* se ha encontrado presente en infecciones del tracto urinario (ITU) causadas por *E. coli* resistente a trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX); Solberg y colaboradores reportaron un estudio de ITU realizados en la comunidad, demostrando la presencia de un grupo clonal albergando estos *cassettes* genéticos en una determinada agrupación geográfica de Estados Unidos (Solberg y col., 2006).

Solo en el patotipo EAEC con integrón de clase 1 está presente el *cassette* *aadB*, curiosamente este gen está asociado a un plásmido de 28 kb, pES1, que contiene un integrón de clase 1 con *aadB*, *bla_{SHV-12}* e *bla_{SHV-12}* e IS26 en *Klebsiella* spp. BLEE positiva (Jones y col., 2005), además puede ser encontrado en aislados provenientes de animales como cerdos y perros (Kadlec, & Schwarz, 2008).

Las cepas DEC con integrones de clase 1 presentan adicionalmente genes *dfrA* (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17*), siendo *dfrA7* y *dfrA1* los más frecuentes. A nivel mundial los subtipos *dfrA* son más prevalentes en África (Gassama y col., 2004; Frank y col., 2007; Dahmen y col., 2010; Labar y col., 2012) mientras que *E. coli* adquirida en la comunidad puede presentarse en niveles bajos en países como: Finlandia con 0–2% (Heikkilä y col., 1990), Corea con 4% (Lee y col., 2001), Bolivia con 2.6% (Pallecchi y col., 2007), España con 3.6% (Vinué y col., 2008), Taiwan con 3.8% (Yang y col., 2009). Gassama y colaboradores, han identificado *dfrA7* en EAEC (Gassama y col., 2004), mientras que en el presente trabajo se encontró en todos los patotipos diarrogénicos y en un aislado de bacteremia.

El *cassette dfrA5* está presente solo en el patotipo ETEC, este *cassette* ha sido estudiado en aislados de *E. coli* con resistencia a trimetoprima de origen humano y animal (Šeputienė y col., 2010).

Los *cassettes dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17* son encontrados en *E. coli* de distintos orígenes, por ejemplo *dfrA12* ha sido encontrado en ITU (Lee y col., 2001), *aadA1* y *dfrA17-addA5* han sido hallados en *E. coli* comensal y UPEC, respectivamente, (Oliveira-Pinto y col., 2017), mientras que el integrón *dfrA15-aadA1* fue asociado con mayor frecuencia con integrones de clase 1 en Tanzania (Manyahi y col., 2017) y detectados en aislados de STEC O111 en humanos y animales (Guerra y col., 2006).

Es importante mencionar que tanto las cepas DEC como las de *E. coli* aisladas de bacteremia que albergan integrasas de clase 2 presentaron de entre los genes *dfrA*, solo el tipo *dfrA1*. Esto puede deberse a que este *cassette* es albergado en el transposón *Tn7* permitiendo su propagación con gran éxito, principalmente debido a su inserción de alta frecuencia en el cromosoma de *E. coli* y muchas otras especies bacterianas (Huovinen y col., 1995). Entre las bacterias resistentes a trimetoprima aisladas clínicamente, el *Tn7* se localiza generalmente en el cromosoma y con menos frecuencia en los plásmidos (Heikkilä y col., 1991).

Solo un aislado de EAEC presentó un gen *cassette catB3*, que codifica Cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), enzima capaz de inactivar el cloranfenicol así como también tiamfenicol y azidamfenicol (Schwarz y col., 2004). Estos genes a menudo se han asociado con transposones de multirresistencia como *Tn840* (Laraki y col., 1999) o multirresistencia transmitida por plásmidos y se han detectado en diversas especies de enterobacterias como *Salmonella* Typhimurium (Bunny y col., 1995; Tosini y col., 1998), *Acinetobacter baumannii* (Houang y col., 2003) y *E. coli* (Wang y col., 2003). Finalmente, otros *cassettes* incluyen marcos de lectura abiertos (ORF), cuyas funciones aún no se han identificado (Hall y col., 1991).

La mayoría de estos aislados albergando integrones de clase 2 portaron genes *sat*, particularmente en EAEC con un gen *sat 2*, una ETEC y EPEC con *sat1* y bacteremia con un gen *sat3*, estos genes *sat* (streptotricin acetiltransferasa) están ubicados en transposones de tipo *Tn7* (*Tn1825* o

Tn1826), que contienen uno de los dos genes de estreptotricina acetiltransferasa relacionados *sat1* o *sat2* (Heim y col., 1989; Tietze y Brevet, 1990). Otro determinante de resistencia a estreptotricina denominado *sat3*, no homólogo a *sat1* y *sat2*, se identificó en el plásmido pIE639 que pertenece al grupo de incompatibilidad IncQ (Tietze y col., 1989; Tietze y Brevet, 1995).

Los aislados de DEC y bacteremia que albergan integrones de clase 1 y 2 en general, presentan una alta resistencia a ampicilina, sulfatrimetropim y tetraciclina pero sensibilidad a ciprofloxacino y gentamicina. Por otra parte, *E. coli* proveniente de sangre presentaron un 59% (13/22) de aislados albergando BLEE fuera de los integrones. La población estudiada fue anteriormente evaluada en un estudio realizado por Ochoa y colaboradores donde describieron a DAEC y EAEC con frecuencias significativamente más altas de resistencia a ampicilina, cotrimoxazol, tetraciclina y ácido nalidíxico que EPEC y ETEC (Ochoa y col., 2009). Estos datos sugieren que la resistencia presentada puede deberse a una tendencia general y no por la presencia de integrones, sin embargo, es probable que EAEC sea más resistente porque está expuesto a medicamentos antimicrobianos más a menudo, debido a la diarrea persistente y/o a menudo a la colonización asintomática que causan. Por lo tanto, la permanencia que tiene dentro del hospedero aumenta la posibilidad de que esté expuesto a medicamentos antimicrobianos y/o adquieran genes resistentes de la flora residente. Estos datos también podrían reflejar que la resistencia pueda ser causada por una variedad de elementos genéticos móviles tales como plásmidos, transposones e inclusive por los integrones o por la alteración en el operón de resistencia a antibióticos de *E. coli* múltiple (*mar*) (Barbosa & Levy, 2000). El fenotipo *Mar* incluye resistencia a antibióticos no relacionados estructuralmente, como tetraciclina, cloranfenicol, beta-lactámicos, fluoroquinolonas, ácido nalidíxico, rifampicina y otros (Maira-Litrán y col., 2000).

La resistencia a los antibióticos asociada a integrones ha sido descrita para EIEC, EAEC y *E. coli* aislados de heces (Okeke y col., 2002; Gassama y col., 2004) y se han reportado plásmidos que benefician la multiresistencia en EPEC (Nwaneshiudu y col., 2007; Hazen y col., 2017).

VIII. CONCLUSIONES

- i. Los aislados de *E. coli* provenientes de diarrea y bacteremia contienen integrones de clase 1 y 2, siendo más frecuentes en aquellos que provienen de bacteremia.
- ii. Los integrones de clase 1 están más frecuentemente asociados a *E. coli* provenientes de bacteremia.
- iii. Los *cassettes* genéticos están presentes en los patotipos provenientes de diarrea y sangre, codificando enzimas que confieren resistencia a los aminoglucósidos (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*), a gentamicina / tobramicina / kanamicina (*aadB*), a trimetoprima (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA15*, *dfrA17*), a cloranfenicol (*catB3*), así como 1 ORF (marco de lectura abierta).
- iv. Solo en integrones de clase 2 tanto de los aislados DEC como de bacteremia, se presentan 3 *cassettes* genéticos de estreptotricina acetiltransferasa, *sat 1* en *ETEC* y *EPEC*, *sat 2* en *EAEC* y *sat 3* en aislados de bacteremia y que confiere resistencia a la estreptotricina.
- v. Los aislados de *E. coli* diarreogénicas y de bacteremia presentan una alta resistencia a ampicilina y a cotrimoxazol, siendo sensibles a gentamicina y ciprofloxacino; las cepas de *E. coli* provenientes de sangre exhiben, además, la presencia de β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en el 59% de los aislados con integrasa 1.

IX. RECOMENDACIONES

- i. Deben analizarse un número mayor de aislados de diferentes localidades para realizar un mejor análisis a nivel nacional.
- ii. Estudiar la presencia de plásmidos involucrados en la transferencia de estos integrones.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMÁBILE-CUEVAS, C. F., & CHICUREL, M. E. (1992). Bacterial plasmids and gene flux. *Cell*, 70(2), 189-199.
- BARBOSA, T. M., & LEVY, S. B. (2000). Differential expresión of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expresión of MarA. *Journal of bacteriology*, 182(12), 3467-3474.
- BARLOW, R. S., PEMBERTON, J. M., DESMARCHELIER, P. M., & GOBIUS, K. S. (2004). Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(3), 838-842.
- BARLOW, R. S., & GOBIUS, K. S. (2006). Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), 1133-1138.
- BENNET, P. M. (1999). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(1), 1-4.
- BENNET, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153 (S1).
- BLAIR, J. M., WEBBER, M. A., BAYLAY, A. J., OGBOLU, D. O. & PIDDOCK, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51.
- BOUCHER, Y., LABBATE, M., KOENIG, J. E. & STOKES, H.W.(2007). Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in microbiology*, 15(7), 301-309.
- BUNNY, K.L., HALL, R.M. & STOKES, H.W. (1995) New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene *aacA7* and a chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 686– 693.
- CAMBRAY G, GUEROUT AM, MAZEL D. (2010). Integrons. *Annu Rev Genet.* 44:141-66.
- CARATTOLI, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 298-304.

- CLARK, N. C., OLSVIK, O., SWENSON, J. M., SPIEGEL, C.A., & TENOFER, F. C. (1999). Detection of a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene (aadA) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(1), 157-160.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentieth Informational Supplement. 2015. M100-s20. Vol 30 Nro 1.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C., & HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2110-2114.
- COURVALIN, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(7), 1447.
- COX, G., & WRIGHT, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 287-292.
- CROWLEY, D., CRYAN, B., & LUCEY, B. (2008). First detection of a class 2 integron among clinical isolates of *Serratia marcescens*. *British journal of biomedical science*, 65(2), 86-89.
- CROXEN, M. A., & FINLAY, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26-38.
- DAHMEN, S., MANSOUR, W., BOUJAAFAR, N., ARLET, G., & BOUALLEGUE, O. (2010). Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 16(1), 43-47.
- DAVIES, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information*, 264(5157), 375-381.
- DENG, Y., BAO, X., JI, L., CHEN, L., LIU, J., MIAO, J., ... & YU, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14(1), 45.
- DI CONZA, J. A., & GUTKIND, G. O. (2010). Integrons: gene collectors. *Revista Argentina de microbiología*, 42(1), 63-78.

- DI CONZA, J. A., POWER, P., & GUTKIND, G. O. (2013). Intercambio de mecanismos de resistencia entre bacterias gram negativas.
- DOMINGUES, S., DA SILVA, G. J., & NIELSEN, K. M. (2012). Integrons: vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile genetic elements*, 2(5), 211-223.
- DOUCET-POPULAIRE, F., TRIEU-CUOT, P., ANDREMONT, A., & COURVALIN, P. (1992). Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36(2), 502-504.
- ESLAMI, G., SEYEDJAVADI, S. S., GOUDARZI, H., FALLAH, F., & GOUDARZI, M. (2010). Distribution of integrons among multidrug resistant *E. coli* and *Klebsiella* strains. *Research in Medicine*, 34(1), 61-65.
- FRANK, T., GAUTIER, V., TALARMIN, A., BERCIÓN, R., & ARLET, G. (2007). Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 742-745.
- FROST, L. S., LEPLAE, R., SUMMERS, A. O., & TOUSSAINT, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 3(9), 722-732.
- GARCÍA, C., HORNA, G., LINARES, E., RAMÍREZ, R., TAPIA, E., VELÁSQUEZ, J., ... & ESPINOZA, N. (2012). Antimicrobial drug resistance in Peru. *Emerging infectious diseases*, 18(3), 520.
- GARZA-RAMOS, U., SILVA-SÁNCHEZ, J., & MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *salud pública de méxico*, 51, s439-s446.
- GASSAMA, A., AIDARA-KANE, A., CHAINIER, D., DENIS, F. & PLOY, M. C. (2004). Integron-associated antibiotic resistance in enteroggregative and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 10(1), 27-30.
- GONZÁLEZ, G., MELLA, S., ZEMELMAN, R., BELLO, H., & DOMÍNGUEZ, M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista médica de Chile*, 132(5), 619-626.
- GUERRA, B., JUNKER, E., SCHROETER, A., HELMUTH, R., GUTH, B. E., & BEUTIN, L. (2006). Phenotypic and genotypic characterization of

antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), 1210-1214.

- GUION, C. E., OCHOA, T. J., WALKER, C. M., BARLETTA, F., & CLEARY, T. G. (2008). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 46(5), 1752-1757.
- HADDADI, A., MOHAMMADI, R., & HARZANDI, N. (2019). Prevalence of Integrons as the Carrier of Multidrug Resistance Genes among Clinical Isolates of *Klebsiella*. *Journal of Medical Bacteriology*, 8(3, 4), 23-30.
- HALL, R. M., BROOKES, D. E., & STOKES, H. W. (1991). Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Molecular microbiology*, 5(8), 1941-1959.
- HALL, R. M., & COLLIS, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular microbiology*, 15(4), 593-600.
- HALL, R. M., & COLLIS, C. M. (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates*, 1(2), 109-119.
- HALL, R. M. (2012). Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1), 71-78.
- HANSSON, K., SUNDTRÖM, L., PELLETIER, A., & ROY, P. H. (2002). IntI2 integron integrase in Tn7. *Journal of bacteriology*, 184 (6), 1712-1721.
- HART, C. A. (1998). Antibiotic resistance: an increasing problem?: It always has been, but there are things we can do. *BMJ: British Medical Journal*, 316(7140), 1255.
- HAZEN, T. H., MICHALSKI, J., NAGARAJ, S., OKEKE, I. N., & RASKO, D. A. (2017). Characterization of a large antibiotic resistance plasmid found in enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171 and its relatedness to plasmids of diverse *E. coli* and Shigella. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, ACC-00995.
- HEIKKILÄ, E., RENKONEN, O. V., SUNILA, R., UURASMAA, P., & HUOVINEN, P. (1990). The emergence and mechanisms of trimethoprim

resistance in *Escherichia coli* isolated from outpatients in Finland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25(2), 275-283.

- HEIKKILÄ, E., SUNDSTRÖM, L., SKURNIK, M. I. K. A. E. L., & HUOVINEN, P. E. N. T. T. I. (1991). Analysis of genetic localization of the type I trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli* isolated in Finland. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(8), 1562-1569.
- HO, P. L., WONG, R. C., CHOW, K. H., & QUE, T. L. (2009). Distribution of integron-associated trimethoprim–sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Letters in applied microbiology*, 49(5), 627-634.
- HOUANG, E.T., CHU, Y.W., LO, W. S., CHU, K. Y. & CHENG, A.F. (2003). Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (bla (IMP-4)) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997-2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1382-1390.
- HUDDLESTON, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist*, 7, 167-176.
- HUOVINEN, P., SUNDSTRÖM, L., SWEDBERG, G., & SKÖLD, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(2), 279.
- ISGlobal. Barcelona Institute for Global Health. Antibiotic Resistance: Not Just a Problem of Patents (Abril 2017). Recuperado de <https://www.isglobal.org>
- JAPONI, A., GUDARZI, M., FARSHAD, S., BASIRI, E., ZIYAEEYAN, M., ALBORZI, A., & RAFAATPOUR, N. (2008). Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in Southern Iran. *Japanese journal of infectious diseases*, 61(1), 85.
- JARLIER, V., NICOLAS, M. H., FOURNIER, G., & PHILIPPON, A. (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases*, 10 (4), 867-878.

- JOHNSON, J. R., & RUSSO, T. A . (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*”. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(3), 155-162.
- JONES, L. A., MCIVER, C. J., KIM, M. J., RAWLINSON, W. D., & WHITE, P. A. (2005). The *aadB* gene cassette is associated with *bla*SHV genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 794-797.
- KADLEC, K., & SCHWARZ, S. (2008). Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(3), 469-473.
- KANG, H. Y., JEONG, Y. S., OH, J. Y., TAE, S.H., CHOI, C.H., MOON, D. C., ...& LEE, J. C. (2005). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(5), 639-644.
- KAPER, J. B., NATARO, J. P., & MOBLEY, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
- KAUSHIK, M., KUMAR, S., KAPOOR, R. K., VIRDI, J. S., & GULATI, P. (2018). Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*, 51(2), 167-176.
- KPMG International Cooperative. KPMG International Annual Review (2014). Recuperado de <https://home.kpmg.com>
- LABAR, A. S., MILLMAN, J. S., RUEBUSH, E., OPINTAN, J. A., BISHAR, R. A., ABODERIN, A. O., ... & OKEKE, I. N. (2012). Regional dissemination of a trimethoprim-resistance gene cassette via a successful transposable element. *PLoS One*, 7(5), e38142.
- LABBATE, M., CASE, R. J., & STOKES, H. W. (2009). The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux*, 103-125.
- LARAKI, N., GALLEN, M., THAMM, I., RICCIO, M. L., AMICOSANTE, G., FRERE, J. M., & ROSSOLINI, G. M. (1999). Structure of *In31*, *bla*IMP-contains in *Pseudomonas aeruginosa* integrons phylogenically related to

In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 890-901.

- LAUPLAND, K. B., CHURCH, D. L., VIDA KOVICH, J., MUCENSKI, M., & PITOUT, J. D. (2008). Community-onset extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *Journal of infection*, 57(6), 441-448.
- LAXMINARAYAN, R., DUSE, A., WATTAL, C., ZAIDI, A. K., WERTHEIM, H. F., SUMPRADIT, N., ...& GREKO, C. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet infectious diseases*, 13(12), 1057-1098.
- LEE, J. C., OH, J. Y., CHO, J. W., PARK, J. C., KIM, J. M., SEOL, S. Y., & CHO, D. T. (2001). The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 599-604.
- LEVESQUE, C., & ROY, P. H. (1993). PCR analysis of integrons. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. *American Society for Microbiology, Washington, DC*, 590-594.
- LEVESQUE, C., PICHE, L., LAROSE, C., & ROY, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(1), 185-191.
- LEVY, S. B. (1986). Ecology of antibiotic resistance determinants. *Banbury Report*, 24, 17-30.
- LEVY, S. B. (1997). Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*, 207, 1-14.
- LIVERMORE, D. M. (2007). Introduction: the challenge of multiresistance. *International journal of antimicrobial agents*, 29, S1-S7.
- LUK-IN S, PULSRIKARN C, BANGTRAKULNONTH A, CHATSUWAN T, KULWICHIT W. (2017). Occurrence of a novel class 1 integron harboring qnrVC4 in Salmonella Rissen. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 88:282-286.
- MACEDO-VIÑAS, M. CORDIERO, N. F., BADO, I., HERRERA-LEON, S., VOLA, M., ROBINO, L., ...& AYALA, J. A. (2009). Surveillance of antibiotic resistance evolution and detection of class 1 and 2 integrons in human isolates of multi-resistant Salmonella Thyphimurium obtained in

Uruguay between 1976 and 2000. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(3), 342-348.

- MACHADO, E., CANTÓN, R., BAQUERO, F., GALÁN, J. C., ROLLÁN, A., PEIXE, L., & COQUE, T. M. (2005). Integron content of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), 1823-1829.
- MACHADO, E., COQUE, T. M., CANTON, R., SOUSA, J. C., & PEIXE, L. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(2), 296-302.
- MAIRA-LITRÁN, T., ALLISON, D. G., & GILBERT, P. (2000). Expression of the multiple antibiotic resistance operon (mar) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 243-247.
- MALEK, M., AMER, F. A., ALLAM, A., EL-SOKKARY, R., GHEITH, T., & ARAFA, M. (2015). Occurrence of classes I and II integrons in Enterobacteriaceae collected from Zagazig University Hospitals, Egypt. *Frontiers in Microbiology*, 6, 601.
- MAMMERI, H., VAN DE LOO, M., POIREL, L., MARTINEZ-MARTINEZ, L., & NORDMANN, P. (2005). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 71-76.
- MANYAHI, J., TELLEVIK, M. G., NDUGULILE, F., MOYO, S. J., LANGELAND, N., & BLOMBERG, B. (2017). Molecular characterization of cotrimoxazole resistance genes and their associated integrons in clinical isolates of gram-negative bacteria from Tanzania. *Microbial Drug Resistance*, 23(1), 37-43.
- MÁRQUEZ, C., LABBATE, M., INGOLD, A. J., CHOWDHURY, P. R., RAMÍREZ, M. S., CENTRÓN, D., ... & STOKES, H. W. (2008). Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(11), 4153-4154.
- MARTIN, G. S., MANNINO, D. M., EATON, S., & MOSS, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*, 348(16), 1546-1554.

- MARTINEZ-MEDINA, M., & GARCIA-GIL, L. J. (2014). *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 5(3), 213.
- MAZEL, D., DYCHINCO, B., WEBB, V. A., & DAVIES, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1568-1574.
- MOOIJ, M. J., SCHOUTEN, I., VOS, G., VAN BELKUM, A., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J, E., SAVELKOUL, P. H. M., & SCHULTSZ, C. (2005). Class 1 integrons in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains from two Dutch hospitals. *Clinical microbiology and infection*, 11(11), 898-902.
- MORABITO, S., TOZZOLI, R., CAPRIOLI, A., KARCH, H., & CARATTOLI, A. (2002). Detection and characterization of class 1 integrons in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 8(2), 85-91.
- MOSQUITO, S., PONS, M. J., RIVEROS, M., RUIZ, J., & OCHOCA, T. J. (2005). Diarrheagenic *Escherichia coli* phylogroups are associated with antibiotic resistance and duration of diarrheal episode. *The Scientific World Journal*, 2015.
- MOSQUITO SG, PONS MJ, MAVES R, SAENZ Y, MERCADO E, VARGAS M, et al. (2010, abril). Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from Peruvian infants. Poster presentado en el 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Vienna, Austria.
- NAJIBI, S., BAKHSHI, B., FALLAHZAD, S., POURSHAFIE, M. R., KATOULI, M., SATTARI, M., ... & TAJBAKHSH, M. (2012). Distribution of class 1 integrons among enteropathogenic *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology*, 58(5), 637-643.
- NATARO, J. P., & KAPER, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
- NAVARRO-GARCÍA, F. (2015). *Escherichia coli* O104: H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli*. American Society of Microbiology. 533-539.

- NWANESHIUDU, A. I., MUCCI, T., PICKARD, D., J., & OKEKE, I. N. (2007). A second large plasmid encodes conjugative transfer and antimicrobial resistance in O119: H2 and some typical O111 enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of bacteriology*, 189(16), 6074-6079.
- O'NEIL, J. (2016). The review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistance infections globally: final report and recommendations. May 2016.
- OCHOA, T. J., RUIZ, J., MOLINA, M., DEL VALLE, L. J., VARGAS, M., GIL, A. I., ... & LANATA, C. F. (2009). High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(2), 296-301.
- OCHOA, T. J., CHEA-WOO, E., BAIOCCHI, N., PECHO, I., CAMPOS, M., PRADA, A., ... & CLEARY, T. G. (2013). Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children. *The Journal of pediatrics*, 162(2), 349-356.
- ODETOYIN, B. W., LABAR, A. S., LAMIKANRA, A., ABODERIN, A. O., & OKEKE, I. N. (2017). Class 1 and 2 integrons in faecal *Escherichia coli* strains isolated from mother-child pairs in Nigeria. *PloS one*, 12(8), e0183383.
- OKEKE, I. N., STEINRÜCK, H., KANACK, K. J., ELLIOTT, S. J., SUNDSTRÖM, L., KAPER, J. B., & LAMIKANRA, A. (2002). Antibiotic-resistant cell-detaching *Escherichia coli* strains from Nigerian children. *Journal of clinical microbiology*, 40(1), 301-305.
- OLIVEIRA-PINTO, C., DIAMANTINO, C., OLIVEIRA, P. L., REIS, M. P., COSTA, P. S., PAIVA, M. C., ... & NASCIMENTO, A. M. (2017). Occurrence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* from healthy individuals and those with urinary infection. *Journal of Medical Microbiology*, 66(5), 577-583.
- DE LA SALUD, A. M. (2016). Plan de acción mundial sobre la Resistencia a los antimicrobianos: Opciones para establecer un marco mundial de Desarrollo y rectoría a fin de respaldar el Desarrollo, el control, la distribución y el uso adecuado de nuevos antimicrobianos , instrumentos diagnósticos, vacunas y otras intervenciones: Informe de la Secretaria (No.A69/24 Add.1). Organización Mundial de Salud.
- PALLECCHI, L., LUCCHETTI, C., BARTOLONI, A., BARTALESI, F., MANTELLA, A., GAMBOA, H., ... & ROSSOLINI, G. M. (2007).

Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(4), 1179-1184.

- PALMA, N., GOMES, C., RIVEROS, M., GARCÍA, W., MARTÍNEZ-PUCHOL, S., RUIZ-ROLDÁN, L., ... & RUIZ, J. (2016). Virulence factors profiles and ESBL production in *Escherichia coli* causing bacteremia in Peruvian children. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 86(1), 70-75.
- PARTRIDGE, S. R., TSAFNAT, G., COIERA, E., & IREDELL, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 757-784.
- PAULSEN, I. T., LITTLEJOHN, T. G., RÅDSTRÖM, P., SUNDSTRÖM, L., SKÖLD, O., SWEDBERG, G., & SKURRAY, R. A. (1993). The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(4), 761-768.
- PÉREZ-MORENO, M. O., ESTEPA, V., SÁENZ, Y., CORTELL-ORTOLÁ, M., FORT-GALLIFA, I., RUIZ, J., & TORRES, C. (2012). Intrahospitalary dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carrying bla DHA-1 and qnrB4 genes within a novel complex class 1 integron. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 73(2), 210-211.
- POIREL, L., CARRÈR, A., PITOUT, J. D., & NORDMANN, P. (2009). Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2492-2498.
- PONS, M. J., MOSQUITO, S., GOMES, C., DEL VALLE, L. J., OCHOA, T. J., & RUIZ, J. (2014). Analysis of quinolone-resistance in commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from infants in Lima, Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108 (1), 22-28.
- RAMIREZ, M. S., VARGAS, L. J., CAGNONI, V., TOKUMOTO, M., & CENTRON, D. (2005) Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(10), 4418-4420.
- RECCHIA, G. D., & HALL, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, 141(12), 3015-3027.

- RECCHIA, G. D., & HALL, R. M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends in microbiology*, 5(10), 389-394.
- RECCHIA, G. D., & SHERRATT, D. J. (2002). Gene acquisition in bacteria by integron-mediated site-specific recombination. In mobile DNA II. *American Society of Microbiology*. 162-176.
- REYES, A., BELLO, H., DOMÍNGUEZ, M., MELLA, S., ZEMELMAN, R., & GONZÁLEZ, G. (2003). Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae from several Chilean hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(2), 317-321.
- RIVEROS, M., GARCÍA, W., GARCÍA, C., DURAND, D., MERCADO, E., RUIZ, J., & OCHOA, T. J. (2017). Molecular and Phenotypic Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Bacteremic Children. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 97(5), 1329-1336.
- ROWE-MAGNUS, D. A., & MAZEL, D. (2001). Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Current opinion in microbiology*, 4(5), 565-569.
- RUSSELL, P. J., & GORDEY, K. (2002). *IGenetics* (No. QH430 R87). San Francisco: Benjamin Cummings.
- RUSSO, T. A., & JOHNSON, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753-1754.
- SABATÉ, M., & PRATS, G. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 20(7), 341-345.
- SÁENZ, Y., BRIÑAS, L., DOMÍNGUEZ, E., RUIZ, J., ZARAZAGA, M., VILA, J., & TORRES, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(10), 3996-4001.
- SALYERS, A. A. & AMABILE-CUEVAS, C. F. (1997). Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination?. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(11), 2321.
- SALYERS, A. A., SHOEMAKER, N. B., STEVENS, A. M., & LI, L. Y. (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of

- integrated gene transfer elements. *Microbiological reviews*, 59(4), 579-590.
- SANDVANG, D. (1999). Novel Streptomycin and Spectinomycin Resistance Gene as a Gene Cassette within a Class 1 Integron Isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(12), 3036-3038.
 - SENDA, K., ARAKAWA, Y., ICHIYAMA, S., NAKASHIMA, K., ITO, H., OHSUKA, S., ...& OHTA, M. (1996). PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *Journal of clinical microbiology*, 34(12), 2909-2913.
 - ŠEPUTIENĖ, V., POVILONIS, J., RUŽAUSKAS, M., PAVILONIS, A., & SUŽIEDĖLIENĖ, E. (2010). Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. *Journal of medical microbiology*, 59(3), 315-322.
 - SHAHCHERAGHI, F., GHEZELGEH, F. R., NOBARI, S., TORABI, E., MOUSAVI, S. F., ASLANI, M. M., & SHAHCHERAGHI, F. (2014). Identification and characterization of class 1 integrons among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age. *Iranian journal of microbiology*, 6(3), 156.
 - SIGUIER, P., FILÉE, J., & CHANDLER, M. (2006). Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current opinion in microbiology*, 9(5), 526-531.
 - SOLBERG, O. D., AJIBOYE, R. M., & RILEY, L. W. (2006). Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 44(4), 1347-1351.
 - STEEL, N. (2017). Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390(10100), 1151-1210.
 - STOKES, H. T., & HALL, R. M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular microbiology*, 3(12), 1669-1683.
 - STOKES, H. W., O'GORMAN, D. B., RECCHIA, G. D., PARSEKHIAN, M., & HALL, R. M. (1997). Structure and function of 59-base element

recombination sites associated with mobile gene *cassettes*. *Molecular microbiology*, 26(4), 731-745.

- STOKES, H. W., & GILLINGS, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 790-819.
- SULCA LOPEZ, M. A. (2010). Identificación y caracterización de integrones y su asociación con la Resistencia a antibioticos en cepas de *Vibrio* spp. aisladas de ambientes marinos contaminados de Lima-Perú. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.
- SUNDE, M. (2005). Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1019-1024.
- TAUCH, A., GOTKER, S., PUHLER, A., KALINOWSKI, J., & THIERBACH, G. (2002). The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene *cassette* aad49 and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid*, 48(2), 117-129.
- THOMAS, C. M., & NIELSEN, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 711-721.
- THOMPSON, B. (1994). Bacterial Antibiotic Resistance—Proof of Evolution?;. *Reason & Revelation*, 14, 61-63.
- TORRES, A. G. (2016). *Escherichia coli* in the Americas. Galveston. USA. Springer
- TOSINI, F., VISCA, P., LUZZI, I., DIONISI, A. M., PEZZELLA, C., PETRUCCA, A. & CARATTOLI, A. (1998). Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3053-3058.
- TRIBUDDHARAT, C., & FENNEWALD, M. (1999). Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(4), 960-962.

- VILA, J., VARGAS, M., CASALS, C., URASSA, H., MSHINDA, H., SCHELLEMBERG, D., & GASCON, J. (1999). Antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(12), 3022-3024.
- VINUÉ, L. SÁENZ, Y., ROJO-BEZARES, B., OLARTE, I., UNDABEITIA, E., SOMALO, S., ...& TORRES, C. (2010). Genetic environment of sul genes and characterization of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *International journal of antimicrobial agents*, 35(5), 492-496.
- VINUÉ, L., SÁENZ, Y., SOMALO, S., ESCUDERO, E., MORENO, M. Á., RUIZ-LARREA, F., & TORRES, C. (2008). Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 934-937.
- VON WINTERSDORFF, C. J., PENDERS, J., VAN NIEKERK, J. M., MILLS, N. D., MAJUMDER, S., VAN ALPHEN, L. B., ...& WOLFFS, P. F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in microbiology*, 7,173.
- WANG, M., TRAN, J.H., JACOBY, G.A., ZHANG, Y., WANG, F. AND HOOPER, D.C. (2003) Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrobial Agents Chemother.* 47, 2242–2248.
- WAYNE, P. A. (2002). National committee for clinical laboratory standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing*, 12.
- WHITE, P. A., MCIVER, C. J., & RAWLINSON, W. D. (2001). Integrons and Gene Cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(9), 2658-2661.
- XIA, W., XU, T., QIN, T., LI, P., LIU, Y., KANG, H., ... & MA, P. (2016). Characterization of integrons and novel cassette arrays in bacteria from clinical isolates in China, 2000-2014. *Journal of biomedical research*, 30(4), 292.
- XU Z, LI L, SHIRTLIFF M, ALAM M, YAMASAKI S, SHI L (2009). Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in

Pseudomonas aeruginosa isolates from patients in southern China. *J Clin Microbiol* 47:230–234.

- YAN, H., LI, L., ZONG, M., ALAM, M. J., SHINODA, S., & SHI, L. (2010). Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in clinical bacterial isolates from patients in South China. *Journal of health science*, 56(4), 442-450.
- YANS, C. M., LIN, M. F., LIN, C.H., HUANG, Y. T., HSU, C. T., & LIOU, M. L. (2009). Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan. *Jpn J Infect Dis*, 62(3), 177-81.
- ZEIGHAMI, H., HAGHI, F., MASUMIAN, N., HEMMATI, F., SAMEI, A., & NADERI, G. (2015). Distribution of integrons and gene cassettes among uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli* isolates in Iran. *Microbial Drug Resistance*, 21(4), 435-440.
- ZHU, J. Y., DUAN, G. C., YANG, H. Y., FAN, Q. T., & XI, Y. L. (2011). Atypical class 1 integron coexists with class 1 and class 2 inetgrons in multi-drug resistant *Shigella flexneri* isolates from China. *Current microbiology*, 62(3), 802-806..
- SCHWARZ, S., KEHRENBERG, C., DOUBLET, B., & CLOECKAERT, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS microbiology reviews*, 28(5), 519-542.

ANEXO 1

Materiales y equipos

1. Materiales

Materiales de plástico

- Placas de Petri
- Asas de siembra
- Puntas para micropipeta
- Tubos de microcentrifugas
- Guantes

Discos de sensibilidad antimicrobiana

- Ampicilina (AMP; disco de 10µg), OXOID
- Gentamicina (GN , disco de 10µg), OXOID
- Trimetopima / sulfametoxazol o Sulfatrimetoprima (STX , disco de 10µg), OXOID
- Ciprofloxacina (CIP ; disco de 10µg), OXOID
- Tetraciclina (TE ; disco 5 µg), OXOID
- Cloranfenicol (C; disco de 30µg), OXOID
- Aztreonam (ATM ; disco 5 µg), OXOID
- Ceftazidima (CAZ , disco de 30µg), OXOID
- Cefotaxima (CTX , disco de 30µg), OXOID
- Ceftriaxona (CRO , disco de 30µg), OXOID
- Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; disco de 30µg), OXOID

Medios de cultivo

Agar Müller-Hinton OXOID

FÓRMULA (en gramos por litro)

Componente	g/l
Infusión de carne deshidratada	300.0
Peptona ácida de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0
pH 7.3 ± 0.1 a 25°C	

Agar MacConkey OXOID

FÓRMULA (en gramos por litro)

Componente	g/l
Peptona de carne	20.0
Lactosa	10.0
Sales biliares	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo neutro	0.075
Agar	12.0
pH 7.4 ± 0.2	

Agar tripticasa de soya (TSA)

FÓRMULA (en gramos por litro)

Componente	g/l
Digerido pancreático de caseína	15.0
Digerido de harina de soya*	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH 7.3 ± 0.2 a 25°C	

* Contiene papaína

Caldo tripticasa de soya (TSB)-OXOID

FÓRMULA (en gramos por litro)

Componente	g/l
Digerido pancreático de caseína	17.0
Digerido péptico de harina de soya*	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico de hidrógeno	2.5
Glucosa	2.5
pH 7.3 ± 0.2 a 25°C	

* Contiene papaína

Insumos de biología molecular

- *Taq* ADN polimerasa
- Oligonucleótidos (cebadores) para detectar los genes de la integrasa:
 - o Integrones (integrasa 1 y 2)
 - o Region variable 1 y 2
- Desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTPs)
- Tampón de reacción 10X
- Cloruro de magnesio (MgCl₂)
- Agua grado biología molecular
- Tampón electroforesis Tris/Borate/EDTA 0.5 X (TBE)

- Tampón de muestra
- Agarosa grado biología molecular
- Marcadores de peso molecular de ADN de 100pb
- Bromuro de étidio
- Enzima de restricción *Hinfl* y su correspondiente tampón
- Bisturí

2. Equipos

- Incubadora 37 ± 1 °C
- Vórtex
- Microcentrifuga
- Espectrofotómetro
- Termociclador (Applied Biosystem)
- Equipo horizontal para electroforesis
- Transiluminador ultravioleta
- Captador de Imagenes
- Micropipetas P10, P50, P200
- Congelador
- Balanza
- Refrigeradora
- Bloque térmico

ANEXO 2: Listado de aislados según código y patotipo

Patotipo: EPEC

Fuente: Diarrea

N°	Código
129	LF 1009, LF 1041, LF 1043, LF 1063, LF 1069, LF 1071, LF1078, LF 1079, LF 1083, LF 1085, LF 1089, LF 1090, LF1090, LF1091, LF 1100, LF 1102, LF 1103, LF 1110, LF1110, LF1116, LF 1121, LF 1128, LF 1129, LF 1131, LF1135, LF1139, LF 1155, LF 1158, LF 1160, LF 1165, LF1177, LF1181, LF 1184, LF 1185, LF 1213, LF 1216, LF1218, LF1223, LF 1225, LF 1235, LF 1236, LF 1236, LF1241, LF1242, LF 1247, LF 1255, LF 1271, LF 1271, LF1273, LF1275, LF 1280, LF 1285, LF 1293, LF 1294, LF1297, LF1297, LF 1306, LF 1311, LF 1322, LF 1327, LF1328, LF1336, LF 1344, LF 1353, LF 1353, LF 1358, LF1369, LF1369, LF 1371, LF 1375, LF 1379, LF 1379, LF1379, LF1379, LF 1401, LF 1416, LF 1416, LF 1420, LF1420, LF1422, LF 1424, LF 1432, LF1436, LF 1438, LF1438, LF 1440, LF 1441, LF 1442, LF 1443, LF 1445, LF1447, LF 1451, LF 1454, LF 1456, LF 1459, LF 1459, LF1460, LF1460, LF 1461, LF 1465, LF 1475, LF 1476, LF1476, LF1478, LF 1491, LF 1500, LF 1502, LF 1509, LF 1511, LF 1511, LF 1513, LF 1516, LF 1517, LF 1517, LF 1522, LF 1523, LF 1524, LF 1528, LF 1528, LF 1530, LF 1532, LF 1539, LF 1541 , LF 1541 , LF 1544 , LF 1545 , LF 1545 , LF 1547, LF 1547, LF 1554.

Patotipo: EAEC

Fuente: Diarrea

N°	Código
90	LF1010, LF1036, LF1137, LF1140, LF1150, LF1150, LF1165, LF1168, LF1172, LF1180, LF1195, LF1208, LF1213, LF1214, LF1224, LF1225, LF1225, LF1227, LF1235, LF1242, LF1256, LF1267, LF1273, LF1273, LF1274, LF1277, LF1286, LF1298, LF1298, LF1299, LF1301, LF1315, LF1317, LF1321, LF1332, LF1333, LF1358, LF1360, LF1373, LF1373, LF1380, LF1381, LF1386, LF1400, LF1401, LF1415, LF1420, LF1425, LF1426, LF1439, LF1443, LF1450, LF1450, LF1450, LF1452, LF1452, LF1462, LF1466, LF1468, LF1475, LF1476, LF1477, LF1482, LF1486, LF1493, LF1495, LF1501, LF1502, LF1503, LF1504, LF1504, LF1507, LF1510, LF1512, LF1518, LF1520, LF1524, LF1524, LF1525, LF1526, LF1527, LF1528, LF1533, LF1534, LF1534, LF1538, LF1541, LF1542, LF1547, LF1547, LF1555.

Patotipo: ETEC

Fuente: Diarrea

N°	Código
66	LF 1078, LF1029, LF1002, LF1065, LF1003, LF1050, LF1102, LF1159, LF 1155, LF1144, LF1102, LF1102, LF1157, LF1130, LF1163, LF1158,LF1133, LF1182, LF1141, LF1226, LF 1216, LF1183, LF1161, LF 1236, LF1295, LF1274, LF1274, LF1263, LF1325, LF1304, LF 1285, LF1340, LF1266, LF1303, LF1324, LF1304, LF1332, LF1350, LF1379, LF1380, LF1301, LF 1293, LF1397, LF1302, LF1387, LF1420, LF1373, LF1379, LF1471, LF1383, LF1491, LF1487, LF1510, LF1524, LF1535, LF1523, LF1523, LF1487, LF1543, LF1543, LF 1498, LF1553,LF 1327, LF1511, LF1553, LF1538.

Patotipo: *E. coli* Extraintestinales

Fuente: Bacteremia

N°	Código
70	Rerm-007, Rerm-033, Rerm-163, Rerm-178, Rerm-203, Rerm-222, Rerm-280, Rerm-281, Rerm-353, Rerm-391, Rerm-394, Rerm-507, Rerm-605, Imp-001, Imp-002, Imp-003, Imp-004, Imp-005, Imp-006, Imp-007, Imp-008, Rch-001, Rch-008, Rch-021, Rch-054, Rch-103, Rch-131, Rch-309, Rch-315, Rch-378, Rch-389, Rch-401, Rch-406, Rch-409, Rch-443, Rseb-034, Rseb-072, Rseb-083, Rseb-084, Rseb-100, Rass-082, Rass-155, Rass-279, Rma-014, Rma-050, Rma-087, Rma-088, Rma-099, Rma-102, Rma-137, Rdac-099, Rdac-137, Hep-001, Hep-002, Hep-003, Ral-123, Rhu-086, Rgai-002, Rgai 061, Rgai-062, Rgai-123, Rgai-262, Rgai-274, Rgai-376, Rgai-557, Rgai-637, Rgai-821, Isn-001, Isn-002, Isn-003,