

**Tesina para optar por el grado de
Licenciado en Ciencias Biológicas**

**Búsqueda de genes de resistencia a antibióticos
en integrones de clase 1 y clase 2 en
Escherichia coli de origen bovino**

Estudiante: Joaquín Frutos

Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Orientadora: Dra. Ana Umpiérrez

Mayo, 2023



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**



Abreviaturas

<i>aacA</i>	Gen casete que codifica resistencia a aminoglucósidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>attC</i>	Sitio de recombinación para el casete
<i>attI</i>	Sitio de recombinación para la integrasa
BHV1	Herpesvirus bovino 1
<i>bla</i> _{CTX-M}	Gen codificante para la resistencia a cefotaximas
BoCV	Coronavirus bovino
BoRV	Rotavirus bovino
BRSV	Virus respiratorio sincitial bovino
BVDV	Virus de la diarrea viral bovina
<i>cmIA5</i>	Gen codificante para la resistencia a cloranfenicol
DIEA	Dirección Nacional de Estadística Agropecuaria
DNT	Diarrea neonatal del ternero
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos
IIBCE	Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
<i>intl1</i>	Gen codificante para la integrasa clase 1
<i>intl2</i>	Gen codificante para la integrasa clase 2
LRA	Laboratorio de Resistencia a Antibióticos
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
orf	Marco abierto de lectura
PAHO	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEGM	Pequeños elementos genéticos móviles
<i>qacE</i> Δ 1	Gen codificante para resistencia a compuestos de amonio cuaternario
RAM	Resistencia antimicrobiana
RV	Región Variable
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
<i>sul1</i>	Gen codificante para la integrasa clase 1
THG	Transferencia horizontal de genes
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo de Triptona de Soja

Resumen

La diarrea neonatal del ternero (DNT) es una enfermedad infectocontagiosa altamente prevalente, que suele afectar a los terneros en su primer mes de vida, lo cual provoca pérdidas económicas importantes en la industria lechera de Uruguay.

Existen tratamientos comúnmente utilizados en la práctica ganadera como estrategia terapéutica para enfermedades infectocontagiosas en los animales, como la antibioticoterapia. Sin embargo, con el paso del tiempo se vuelven menos eficaces debido a la aparición de resistencia antimicrobiana (RAM).

La DNT es una enfermedad multifactorial debido a que existen diversos patógenos que pueden estar implicados en el desarrollo de la patología. Varios reportes han demostrado el rol de *Escherichia coli* en la enfermedad, sin embargo, los mecanismos que le otorgan resistencia a antibióticos aún no han sido completamente esclarecidos.

Existen diversas estrategias de ganancia de genes de resistencia en bacterias, por ejemplo, mediante la adquisición de material genético nuevo de una fuente exógena, lo cual se conoce como transferencia horizontal de genes. Un mecanismo de transferencia horizontal de genes de resistencia puede darse a través de elementos genéticos móviles como lo son los integrones. Un integrón es una plataforma genética bacteriana capaz de integrar, escindir, reorganizar y expresar múltiples casetes de genes. Se ha descrito previamente la presencia del integrón de clase 1 en *E. coli* aisladas de terneros con DNT, lo cual podría estar asociado al uso de antibióticos en los rodeos debido a la diseminación horizontal de los genes de resistencia.

El presente trabajo se encuentra dirigido a la identificación y caracterización de los integrones de clase 1 y clase 2 a través de herramientas moleculares, en terneros neonatales que presentan sintomatología de DNT y en terneros sin sintomatología provenientes de un tambo de San José. Para analizar la presencia del integrón de clase 1 se determinó la presencia del gen de la integrasa clase 1 (*intI1*) presente en la región conservada 5' del integrón de clase 1, y los genes *qacEΔ1* y *sul1* presentes en la región 3' de dicho integrón. Se observó la presencia de los tres genes en 46 de los 166 aislamientos estudiados. No se detectó el integrón de clase 2 en ninguno de los aislamientos estudiados y tampoco se evidenció la presencia de la secuencia *ISCR1*. Posteriormente, se analizó qué genes estaban presentes en la región variable del integrón de clase 1 mediante secuenciación de los integrones y análisis bioinformáticos de las secuencias. Se determinó la presencia del gen *aadA* que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina en los integrones de clase 1 provenientes de animales sanos y enfermos. No se determinó una asociación entre los signos de la enfermedad y la presencia del integrón de clase 1.

Índice

1. Introducción.....	5
Origen de las enfermedades en terneros.....	5
DNT en Uruguay.....	6
Prevención y tratamiento de la DNT.....	6
Antibióticos, marco teórico de su estrategia y fundamento.....	7
Resistencia a Antimicrobianos (RAM) y su problemática mundial.....	10
Los integrones y su papel en la RAM.....	11
RAM en Uruguay.....	13
2. Hipótesis de trabajo.....	14
3. Objetivo general.....	14
4. Objetivos específicos.....	14
5. Materiales y métodos.....	15
5.1. Cepas bacterianas.....	15
5.2. Extracción de ADN.....	15
5.3. Cuantificación en Nanodrop.....	15
5.4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	15
5.6. Secuenciación de integrones.....	17
5.7. Análisis bioinformáticos de las secuencias.....	17
5.8. Análisis bioestadístico.....	17
6. Resultados.....	18
6.2 Amplificación de la región variable.....	19
6.3 Secuenciación de la región variable.....	20
7. Discusión.....	22
8. Conclusiones.....	24
9. Perspectivas.....	24
10. Bibliografía.....	26

1. Introducción

Ganadería en Uruguay y sus complicaciones subyacentes

Uruguay es uno de los países productores de carne más importante a nivel mundial, reconocido por sus amplias praderas y gran número de hectáreas de pastoreo, con cifras que se aproximan a los 13 millones de hectáreas. Uruguay es considerado uno de los principales productores cárnicos del mundo, comprendiendo la carne entre un 20% y 25% de todas las exportaciones anuales. Por otro lado, la producción de leche y subproductos también comprende una importante actividad agropecuaria nacional, destinándose dichos productos principalmente al consumo interno y a la exportación. Sólo la exportación de la leche comprende el 9,1% de las exportaciones anuales (Anuario Estadístico Agropecuario 2021, (DIEA)).

La producción ganadera en Uruguay tradicionalmente fue del tipo extensiva, pero en las últimas décadas se ha ido transformando a un carácter más intensivo por el gran beneficio económico que genera. La ganadería intensiva promueve un aumento en el número de animales en una superficie menor, aumentando la eficiencia de los recursos y la productividad por unidad de superficie. Si bien la estrategia parece muy efectiva, su aplicación conlleva consecuencias inmediatas, como el estrés de los animales confinados en espacios más reducidos y el aumento en la transmisión de enfermedades infectocontagiosas entre ellos (Bazeley, 2003; Gulliksen et al., 2009; Marcé et al., 2010). Dado que la producción intensiva promueve la propagación de enfermedades infectocontagiosas como neumonías, conjuntivitis y diarreas neonatales, es de fundamental importancia estudiar los mecanismos asociados a estas patologías para poder mejorar los tratamientos con los que se afrontan estas enfermedades.

Origen de las enfermedades en terneros

Una de las enfermedades infectocontagiosas más frecuente y con altos índices de morbimortalidad en los terneros son las neumonías, las cuales pueden ser causadas por diferentes patógenos incluyendo virus y bacterias. Dentro de las bacterias que generan esta sintomatología se encuentran *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Bibersteiniatrehalosi* y *Mycoplasma bovis* (Mehinagic et al., 2019). A su vez, se ha reportado que las infecciones virales pueden potenciar las acciones de estas bacterias (Griffin et al., 2010). Los virus asociados de manera más frecuente a las neumonías son el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), herpesvirus bovino 1 (BHV1), virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y virus de la parainfluenza bovina 3 (Mehinagic et al., 2019).

Las neumonías no son la única causa de muerte temprana en bovinos, existen otras patologías potencialmente letales para los terneros dadas por microorganismos. La septicemia es el término que se usa para referirse a una enfermedad sistémica multiorgánica caracterizada por la presencia de un patógeno o sus toxinas en la sangre (Fecteau et al., 2009). La septicemia no necesariamente es causada exclusivamente por un solo tipo de microorganismo, sin embargo, hace tiempo que se considera que *Escherichia coli* es el principal responsable de esta patología, así como también de la meningitis, la cual aparece como una complicación de la septicemia (Fecteau et al., 2009) y de la diarrea neonatal del ternero (DNT).

La DNT es una enfermedad infectocontagiosa, compleja y multifactorial, la cual puede ser relacionada a diversos patógenos. Entre los microorganismos responsables de la DNT se destacan *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *Cryptosporidium parvum*, *Salmonella* entérica, y patógenos virales de la familia de los rotavirus y coronavirus (Kolenda et al., 2015). Debido al impacto en la salud de los terneros neonatos, esta enfermedad ha sido reconocida como uno de los mayores retos de las industrias ganaderas y lecheras a nivel mundial (Lorenzet al. 2011), siendo una de las principales causas, junto con las neumonías infecciosas, de mortandad en terneros en las primeras semanas de vida (Constable et al., 2017).

DNT en Uruguay

La DNT es una enfermedad infectocontagiosa que suele afectar a terneros de entre 12 h y 35 días de vida, perjudicando principalmente a la industria lechera, afectando directamente la economía y producción de los establecimientos (Lorenz et al., 2011; Margueritte et al., 2007). En los últimos años nuestro grupo de trabajo ha investigado a *E. coli* asociadas a casos de DNT en terneros de lechería en Uruguay con el fin de establecer las características de los patógenos asociados, y así mejorar las estrategias de prevención y manejo de los animales en los rodeos. En particular, se ha estudiado la relación entre los genes de virulencia de *E. coli* patógenas en terneros de lechería (Umpiérrez A., 2016; Umpiérrez et al., 2021), así como se han desarrollado estudios en cuanto a los fenotipos de resistencia y la presencia de genes de resistencia transferibles en estos aislamientos, incluyendo a la variante zoonótica *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Coppola et al., 2020; Umpiérrez et al., 2017, 2022).

Prevención y tratamiento de la DNT

Dentro de las estrategias de prevención de la enfermedad se encuentra el correcto de manejo de los animales sintomáticos en los establos, para evitar contagios, y adecuadas prácticas de higiene. Además, es esencial el consumo de calostro. Debido a que los terneros no nacen

con un sistema inmunitario activo, una de las acciones fundamentales a realizar es asegurarles el consumo del primer calostro de la madre. El mismo le provee de las inmunoglobulinas, así como de una batería de nutrientes que asistirán al desarrollo de las defensas del neonato (Chase et al., 2008; Godden et al., 2020).

Como forma de reforzar en el ternero la adquisición de anticuerpos por inmunidad pasiva se han desarrollado protocolos y estrategias de vacunación, esperando que generen una protección frente a los distintos patógenos causantes de la DNT (Crouch et al., 2001; Gonzalez et al., 2021; Recca et al., 2003). Dentro de las vacunas que se utilizan ampliamente en el mundo y en Uruguay, se destacan las vacunas trivalentes creadas para inmunizar al ganado contra rotavirus bovino (BoRV), coronavirus bovino (BoCV) y contra la adhesina F5 (K99) de *E. coli*. Estas vacunas se administran a las madres gestantes en el último trimestre del embarazo, de forma que luego del nacimiento los terneros adquieren a través del consumo del calostro los anticuerpos contra los patógenos. Se ha establecido que esta estrategia reduce la cantidad de infecciones y los síntomas generados por estos patógenos drásticamente (Žuffa et al., 2019).

Por otro lado, mientras transcurre la diarrea, uno de los tratamientos que se realiza es alimentar al bovino enfermo con leche de vaca, dado que la misma le aporta factores de crecimiento que facilitan la recuperación, además de contener nutrientes (Constable, 2009). La DNT produce una fuerte deshidratación de los animales afectados, la cual puede determinar la aparición de disfunción renal, pérdida de bicarbonato y acumulación de lactato, que finalmente puede provocar acidosis metabólica y muerte en algunos casos (Lorenz et al., 2011). En estas situaciones resulta de gran utilidad la terapia hidrolítica, la cual se ha reportado que se debe acompañar de la dieta habitual del animal (Lorenz et al., 2011).

Otra terapia utilizada, es la antibioticoterapia, una estrategia que se ha utilizado en enfermedades como la DNT (Carter et al., 2021). Si bien dicha terapia es efectiva en algunos casos, y tiende a resolver numerosas infecciones, conlleva frecuentemente a la aparición de cepas resistentes y multirresistentes (Constable, 2004).

Antibióticos, marco teórico de su estrategia y fundamento

Los antibióticos son compuestos que inhiben o matan bacterias (también llamadas drogas bacteriostáticas o bactericidas, respectivamente) mediante interacciones específicas hacia un tipo de célula bacteriana blanco (Levison & Levison, 2009). Los antibióticos de uso comercial se utilizan de manera generalizada hace más de 80 años, y a pesar del incremento en la calidad de vida que han generado, su uso indiscriminado e inadecuado también trajo nuevos desafíos

que son al día de hoy, unos de los principales problemas que afronta la humanidad: el aumento de cepas multirresistentes a distintos compuestos antimicrobianos. Considerando que los antibióticos poseen un potencial terapéutico enorme, resulta fundamental esclarecer los mecanismos de acción de los mismos para encontrar alternativas que permitan un uso adecuado.

Los grupos de antibióticos que se utilizan más frecuentemente en medicina veterinaria son aquellos incluidos en cinco familias principales: β -lactámicos; aminoglucósidos; fluoroquinolonas; tetraciclinas y anfenicoles. Los β -lactámicos actúan mediante la inhibición del último paso de la síntesis de la pared celular bacteriana. Esta acción se considera un mecanismo bactericida lento, con actividad dependiente del tiempo, con buena distribución corporal y con toxicidad escasa (Suárez & Gudiol, 2009). Por otro lado, los aminoglucósidos, son antibióticos bactericidas que detienen el crecimiento bacteriano actuando sobre sus ribosomas, inhibiendo la síntesis proteica. Las fluoroquinolonas se consideran antibióticos de amplio espectro, lo que las convierte en un compuesto muy efectivo frente a un gran número de bacterias. Actúan principalmente afectando la función de dos enzimas fundamentales que son la topoisomerasa IV y la ADN girasa. Las tetraciclinas se consideran bacteriostáticos y actúan principalmente mediante la inhibición de la síntesis proteica, uniéndose a la subunidad 30S ribosomal. Finalmente, los anfenicoles tienen un amplio espectro de efectos inhibitorios, que actúan tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas. Los antibióticos integrantes de esta familia basan su mecanismo de acción en interferir la síntesis proteica bacteriana a través del bloqueo de subunidades ribosomales (Arenz & Wilson, 2016).

Si bien el uso de antibióticos está ampliamente reportado como una herramienta clave para controlar ciertas enfermedades infectocontagiosas, para el tratamiento de patologías como la DNT se han reportado resultados contrarios. La administración oral de penicilina, cloranfenicol y neomicina incrementan la incidencia de diarrea en terneros sanos (Constable, 2004) y por otro lado, la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha declarado que oxitetraciclinas y sulforopiridiazinas administradas de forma parenteral o amoxicilina, clorotetracilina, neomicina, estreptomycin y tetraciclina por vía oral pueden ser un tratamiento adecuado contra bacterias entéricas como *E. coli* en la DNT (Constable, 2003).

Uso y abuso de los antibióticos

El uso de antibióticos ha resultado ser una medida eficiente en el tratamiento de enfermedades infecciosas en la industria agropecuaria. Sin embargo, muchas veces no se realizan estudios de sensibilidad previo a su administración, o simplemente se los utiliza como medida de metafilaxis. La metafilaxis es un tratamiento que se utiliza a nivel de rodeo, cuando se evidencia enfermedad en algunos de los animales. El antibiótico se administra de forma generalizada a todos los animales, independientemente de la sintomatología que presenten, y sin realización de estudios de sensibilidad previos (Constable, 2004; Lorenz et al., 2011). Como se mencionó más arriba, en los casos de terneros enfermos con diarrea existe la posibilidad de que ésta esté dada como consecuencia de una infección viral, y por lo tanto el antibiótico no ejercería ningún efecto sobre la resolución del cuadro infeccioso. Esta técnica actualmente no se recomienda y en su lugar se estimula a realizar estudios para detectar al patógeno y conocer su susceptibilidad antibiótica previo al tratamiento (Constable, 2009; Lorenz et al., 2011).

También relacionado a la antibioticoterapia, una estrategia que se utilizó por muchos años en la clínica veterinaria fue la utilización de los antibióticos como promotores de crecimiento. Esta estrategia implica la administración de agentes antimicrobianos a grupos enteros de animales durante períodos prolongados de tiempo y en dosis subterapéuticas (McEwen, 2018). Los promotores de crecimiento animal fueron de aplicación generalizada por décadas, y si bien inicialmente se consideraba que no aumentaban significativamente la resistencia, hoy en día se sabe que sí contribuyeron en el aumento de la resistencia antimicrobiana. Por esta razón, la OMS y la FAO prohibieron su uso para ese fin (World Health Organization (WHO), 2017). Gracias a normativas vigentes en distintos países se ha reducido significativamente su uso a nivel mundial en comparación a los datos publicados en el año 2012 (OIE, 2018). En Uruguay, de acuerdo al Decreto N° 98/011 que rige desde 2011 está prohibido el uso de antibióticos en la alimentación para animales ovinos y bovinos.

Para garantizar el uso adecuado de antimicrobianos, resulta relevante la adecuada prescripción de éstos por los profesionales de la salud animal. Se ha reportado que diferencias importantes en la cantidad de antibióticos suministrada a animales está dada por variaciones en la prescripción de estos fármacos, debido a diferencias en los hábitos de prescripción de los veterinarios (Jerab et al., 2022). Peor aún, se reconoce la existencia de acceso sin prescripción de los antibióticos y un mal almacenamiento y administración de los mismos (Andrade FF, Pina-Vaz C, 2018). Estos datos implican no solo un potencial uso inadecuado de antibióticos sino también un sesgo de información en los trabajos de investigación de antimicrobianos.

Resistencia a Antimicrobianos (RAM) y su problemática mundial

La resistencia a antimicrobianos (RAM) es un desafío a nivel mundial (World Health Organization (WHO), 2017). La RAM se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos) (Organización Panamericana de la Salud, 2022). El uso desmedido de los antibióticos ha llevado a la generación y a la persistencia de cepas multirresistentes, y como consecuencia, son cada vez más comunes los tratamientos fallidos o con baja eficacia.

La RAM se considera un problema sanitario tanto para la salud humana, animal como para la agricultura, de modo que se han generado planes de acción para abarcar esta preocupación mediante el enfoque de "Una Sola Salud". La tasa de mortalidad por enfermedades ocasionadas por bacterias multirresistentes en todo el mundo es muy elevada. Se estima que para el 2050 el número de muertes asociadas a RAM podría ascender a 10 millones de personas al año (PAHO, www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal). Desde la perspectiva veterinaria y agronómica, en un informe reciente se ha reportado que más del 70% de los antibióticos definidos como medicamento importantes por la FDA son aplicados en animales (Jim O'Neill, 2016). En este sentido la OMS, en concordancia con las demás organizaciones que tienen por objetivo reducir el problema de la RAM, han generado directrices que pretenden reducir el uso indiscriminado de antibióticos en salud animal, particularmente su uso en estimulación del crecimiento y uso preventivo (en ausencia de enfermedad). Además, se insta a utilizarlos de manera moderada y controlada cuando tienen fines de control y terapéutico en presencia de enfermedad. En este sentido, en Uruguay se elaboró y puso en marcha en 2018 un "Plan nacional de contención de la resistencia antimicrobiana", liderado por el MGAP y con la participación de distintos actores de la academia y del sector agropecuario nacionales (Bennett et al., 2017). El mismo, tiene una serie de objetivos específicos entre el que se destaca el de desarrollar una vigilancia "Una Salud" en Resistencia Antimicrobiana y un uso de los antimicrobianos en el sector agropecuario coordinado a nivel nacional (Bennett et al., 2017).

Una preocupación adicional en este escenario de multirresistencia resulta de la interacción que se puede dar entre bacterias comensales y patogénicas, principalmente por los mecanismos de transferencia horizontal de genes. Particularmente, se ha reportado que *E. coli* podría actuar como un potencial reservorio de resistencia antimicrobiana dada por estos mecanismos (Poirel et al., 2018).

La resistencia antibiótica en bacterias puede clasificarse en intrínseca, adquirida o adaptativa. La resistencia adquirida ocurre cuando la bacteria obtiene la resistencia por mutaciones o por

la adquisición de material genético nuevo de una fuente exógena, lo cual se conoce habitualmente como transferencia horizontal de genes (THG) (Christaki et al., 2019). La THG puede ocurrir a través de tres mecanismos fundamentales: transformación, transducción y conjugación. La transformación ocurre cuando fragmentos de ADN libres de una bacteria muerta son internalizados por bacterias competentes y luego son incorporados al cromosoma de una bacteria receptora. La transducción se da por transferencia genética mediada por un bacteriófago (Christaki et al., 2019), y la conjugación es el mecanismo que tiene como particularidad la transferencia de material genético entre bacterias por medio de contacto físico directo. Esta última se da cuando el pili sexual actúa de conector, permitiendo el pasaje de un plásmido de la célula donante hacia la célula receptora. Considerando que en un único plásmido pueden existir varios genes de resistencia, la resistencia antibiótica a múltiples fármacos puede darse en un único evento de conjugación. Para que esto ocurra, los múltiples genes de resistencia pueden encontrarse en un solo plásmido y, a su vez, asociados mediante secuencias de inserción, transposones o integrones (Christaki et al., 2019). Los plásmidos también son elementos genéticos móviles.

Los integrones y su papel en la RAM

Un integrón es una plataforma genética bacteriana capaz de integrar, escindir, reorganizar y expresar múltiples casetes de genes. Esto se debe a que los casetes son pequeños elementos genéticos móviles (PEGM) de manera tal que el integrón logra impulsar la expresión de uno o más casetes de genes ubicados en la región variable (RV) mediante un sistema de recombinación específica de sitio (Hall & Collis, 1995). El integrón se encuentra organizado en tres regiones, una región variable central, donde usualmente se encuentran los genes de resistencia, flanqueada por dos regiones conservadas. En el extremo 5' (5' CS) conservado se encuentra el gen que codifica para una integrasa capaz de catalizar la reacción sitio-específica (*intI*), esta integrasa se ha utilizado para definir las distintas clases de integrones, denominándose *intI1* e *intI2* para el integrón de clase 1 o de clase 2, respectivamente. La integrasa cataliza la recombinación mediante los sitios de recombinación (*attI*) dando como resultado la inserción o escisión de cassettes. *IntI1* reconoce los sitios de recombinación *attI1* y *attC*, mientras que *intI2* reconoce al sitio *attI2*. Finalmente, la región promotora (P) es la que permite la expresión de los genes incorporados, la cual se conoce como Pc para ambos integrones.

Por otro lado, el integrón de clase 1 posee una región conservada en el extremo 3' (3' CS) donde se encuentran dos genes que confieren resistencia a sulfonamidas (*sul1*) y a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*) (Cury et al., 2016; di Conza & Gutkind, 2010; Poey et al., 2019). El integrón de clase 2 no presenta un extremo 3' altamente conservado

como ocurre con el integrón de clase 1 debido a que sus secuencias pueden variar, ya sea por delección o inserción de secuencias de inserción o genes específicos.

Se ha descrito que las especies huésped de los integrones de clase 1 están altamente conservadas en la clase Gammaproteobacteria, de manera tal que su distribución se restringe principalmente a algunas familias de este grupo, como son *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae* (Zhang et al., 2018).

Si bien un integrón presenta un sitio de recombinación sitio-específico, éstos no tienen la capacidad de movilizarse, sino que se los ha encontrado estrechamente asociados a estructuras genéticas móviles que sí tienen dicha capacidad, como transposones dentro de plásmidos conjugativos (Cambray, et al., 2010; di Conza & Gutkind, 2010; Mazel, 2006; Poey & Laviña, 2018).

Los integrones de clase 1 pueden estar vinculados a estructuras complejas denominadas secuencias de inserción que contienen regiones comunes 1 (ISCR1, del inglés Insertion Sequence containing Common Region 1). Existe evidencia de que los ISCR1 constituyen un sistema de captura de genes de resistencia a antibióticos y que juegan un papel importante en su propagación. Los ISCR1 son elementos genéticos móviles que contienen una recombinasa que facilita la recombinación y movilización de secuencias adyacentes, incluyendo casetes de genes contenidos en integrones (Toleman et al., 2006a, 2006b). La presencia de elementos ISCR1 cerca de integrones de clase 1 o clase 2 puede incrementar aún más la capacidad de estas estructuras para adquirir, reorganizar y expresar genes de resistencia, lo que contribuye a la adaptabilidad y supervivencia de las bacterias frente a diferentes condiciones y presiones selectivas. A estos integrones de clase 1 asociados a ISCR1 se les denomina integrones de clase 1 complejos (Rui et al., 2018).

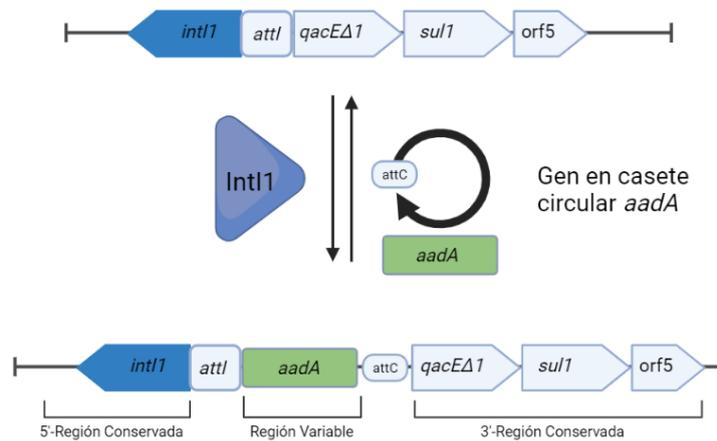


Figura 1: Esquema y modelo de integración y escisión de casetes de genes en un integrón. *int1*, gen que codifica la integrasa clase 1; *aadA*, codifica para adeniltransferasa, confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos. En la flecha circular negra se destaca el casete circular con el gen *aadA*, con el sitio de reconocimiento de la integrasa *attC* como parte de su estructura; las flechas de los bloques indican la dirección de la transcripción. También se encuentran representados los genes *qacEΔ1* y *sul1*, así como las regiones conservadas 3' y 5' y la región variable.

RAM en Uruguay

En el marco de los planes de acción con enfoque de “Una Sola Salud” resulta relevante la consideración de la RAM en terneros de lechería. Particularmente, en un país ganadero como es Uruguay este abordaje es clave. En trabajos de nuestro grupo se ha identificado la presencia de *E. coli* en heces de terneros con sintomatología de DNT y en terneros sanos de diversos tambos de Uruguay. En un primer estudio, desarrollado entre 2012 y 2014, un porcentaje elevado de los aislamientos de *E. coli* patógenas estudiadas presentaban un fenotipo de multiresistencia, así como genes de resistencia transferibles (*qnrS1*, *bla_{CTX-M-14}*) y el integrón clase 1 con arreglos de genes que incluían a *dfrA7*, *dfrA17-aadA5*, *dfrA1-aadA1*, y *dfrA12-orfF*- de resistencia a trimetoprim y aminoglucósidos (Umpiérrez et al., 2017). Más tarde, en otro muestreo realizado en terneros neonatales (menores de 35 días de vida) sanos y enfermos con diarrea entre 2016 y 2018 se determinó que existían elevados valores de RAM entre los aislamientos de *E. coli* patógenas, no encontrándose multiresistencia. En dicho trabajo se detectaron más genes de resistencia transferibles no descritos hasta el momento, como *qnrB19*, *qnrS1*, *fosA7* y *bla_{CTX-M-15}* (Coppola et al., 2020; Umpiérrez et al., 2022). La presencia de los integrones de clase 1 y clase 2 no fueron evaluados en este segundo muestreo (2016-2018).

2. Hipótesis de trabajo

Aislamientos de *E. coli* procedentes de terneros neonatales sanos y con DNT de un tambo en San José presentan integrones de clase 1 y clase 2 y el marco de lectura abierto ISCR1. Dichos integrones contienen genes que codifican para distintos genes de resistencia a antibióticos.

3. Objetivo general

Detectar y caracterizar los integrones de clase 1 y de clase 2 presentes en *E. coli* aisladas de heces de terneros con diarrea neonatal y en terneros sin síntomas de la enfermedad en un tambo de San José en 2016.

4. Objetivos específicos

1. Detectar el gen de la integrasa de clase 1 (*intl1*) y la integrasa de clase 2 (*intl2*) presentes en la región conservada 5' de los integrones clase 1 y 2, y los genes *qacEΔ1* y *sul1* presentes en la región 3' del integron de clase 1.
2. Determinar la presencia de la secuencia ISCR1 en aquellos aislamientos que presentan el gen *intl1*.
3. Amplificar y secuenciar las regiones variables de los integrones detectados.
4. Determinar mediante herramientas bioinformáticas qué genes de resistencia presenta cada región variable secuenciada.

5. Materiales y métodos

5.1. Cepas bacterianas

A partir de las heces de 20 individuos se realizaron entre 8-10 aislamientos por individuo (obteniendo 166 aislamientos en total) de *E. coli* patógenas del cepario del Departamento de Microbiología del IIBCE, los cuales fueron obtenidos a partir del cultivo de heces de terneros con DNT y de terneros asintomáticos para la enfermedad. Dichos aislamientos provenían de terneros de un tambo en el departamento de San José. La colecta y caracterización primaria de los aislamientos se realizó en 2016 por parte de investigadores y veterinarios de INIA-La Estanzuela, en el marco de un proyecto de investigación en colaboración con nuestro Departamento (Umpiérrez et al., 2021). Todos los aislamientos se encuentran conservados en criotubos conteniendo Caldo de Triptona de Soja (TSB)-Glicerol 20%, a -80°C en el Depto. de Microbiología.

5.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por lisis térmica. Cada aislamiento se cultivó a 37°C en medio Agar Triptona de Soja (TSA). Transcurridas 18-24h se picaron 3 colonias las cuales se re-suspendieron en 1ml de H₂O destilada, y se calentaron durante 1 minuto a 95°C. Luego de la disrupción por calor se separó el ADN total por centrifugación. El sobrenadante conteniendo el material genético se almacenó a -20°C hasta su cuantificación y posterior utilización en los PCR. (Umpiérrez A., 2016)

5.3. Cuantificación en Nanodrop

Para determinar la calidad del ADN total obtenido de cada aislamiento se utilizó NanoDrop (Invitrogen), y una alícuota de 1µl de cada lisado. En cada muestra se corrigió la concentración hasta conseguir un valor considerado aceptable (50µg/ml aprox.) para utilizar en los PCR.

5.4. Reacción en cadena de la polimerasa

Se amplificaron por PCR los genes *int1* (codifica para la integrasa clase 1) (Rosser & Young, 1999); *int2* (codifica para la integrasa clase 2) (Orman et al., 2002); *qacEΔ1* (provee de propiedad de resistencia a compuestos de amonio cuaternario) (Ebner et al., 2004); *sul1* (provee de resistencia a sulfonamidas) (Ebner et al., 2004) e *ISCR1* (anteriormente conocido como orf513, marco abierto de lectura con presunta actividad regulatoria en el reclutamiento génico) (Partridge & Hall, 2003). Para los genes *int1*, *qacEΔ1*, y *sul1* se utilizaron ciclados y mezcla de reacción de rutina en el laboratorio (Umpiérrez et al., 2017), mientras que para la amplificación parcial de *ISCR1* se realizó una puesta a punto del ciclado y concentración a

partir de lo realizado por Power y colaboradores (Power et al., 2005). Como controles positivos se utilizaron ADN cedidos por investigadores del Laboratorio de Resistencia a Antibióticos (LRA) del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene (Facultad de Medicina, UDELAR).

Tabla 1 Primers utilizados, y ciclado de los mismos.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)	Mezcla de Reacción (vol. Final 25µl)	Ciclado		
<i>int1-F</i>	ATCATCGTCGTAGAGACGTCCG	892	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de buffer de la enzima	10 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min 57 °C, 2 min a 70 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C		
<i>int1-R</i>	GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGC					
<i>int2-F</i>	GCAAATGAAGTCAACGC	700				
<i>int2-R</i>	ACACGCTTGCTAACGATG					
<i>qacEΔ1-F</i>	GAGGGCTTTACTAAGCTTGC	200	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de buffer de la enzima	10 min a 94 °C, [1 min a 95 °C, 30 s a 65 °C, 2 min a 70 °C] x 9, [1 min a 95 °C, 30 s a 55 °C, 2 min a 70 °C] x 14, extensión 5 min a 72 °C		
<i>qacEΔ1-R</i>	ATACCTACAAAGCCCCACGC					
<i>sul1-F</i>	ATCAGACGTCGTGGATGTCCG	346				
<i>sul1-R</i>	CGAAGAACCGCACAATCTCG					
<i>orf513-F</i>	AAACCAGCATGGTTGGCTAC	1000			0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 1 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de buffer de la enzima.	10 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min 53 °C, 2 min a 70 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C
<i>orf513-R</i>	CCGTTAGCTCTTATGTGGG					
5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	Variable	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de buffer de la enzima.	5 min a 95 °C, [45 s a 94 °C, 45 s a 50 °C, 2 min a 72 °C] x 35 °C, extensión 7 min a 72 °C		
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGAT					

5.5. Electroforesis en geles de agarosa

Una alícuota de cada producto de PCR se corrió en geles de agarosa entre 0,8% y 1% y se realizó la tinción con GelRed. Los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta. El número de nucleótidos esperados para cada amplicón se estimó mediante la utilización del marcador de tamaño molecular 1kb Plus (Invitrogen, Thermo Fischer).

5.6. Secuenciación de integrones

Se amplificaron por PCR las regiones variables de aquellos integrones que presentaron simultáneamente las secuencias *int1*, *sul1* y *qacE Δ 1*, a partir de primers previamente diseñados (Bado et al., 2010). Dichos productos de PCR se enviaron para su secuenciación en MacroGen Inc. (Corea del Sur), con el fin de poder obtener las secuencias y generar el perfil de genes de resistencia a antibióticos presente en ellos.

5.7. Análisis bioinformáticos de las secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante programas bioinformáticos de libre acceso como BioEdit (v 7.1) y se compararon contra secuencias conocidas en la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.8. Análisis bioestadístico

Con la información adquirida, se estudió la correlación entre la presencia de genes de resistencia en las cepas provenientes de terneros con la enfermedad contra las cepas provenientes de terneros asintomáticos mediante el programa informático RStudio (2022.07.2+576).

6. Resultados

Se analizaron 166 aislamientos de *E. coli* provenientes de terneros sanos y enfermos. En primer lugar, se buscó y evidenció la presencia del gen *int1* (Fig. 2), habiéndose detectado en 86/166 (52%).

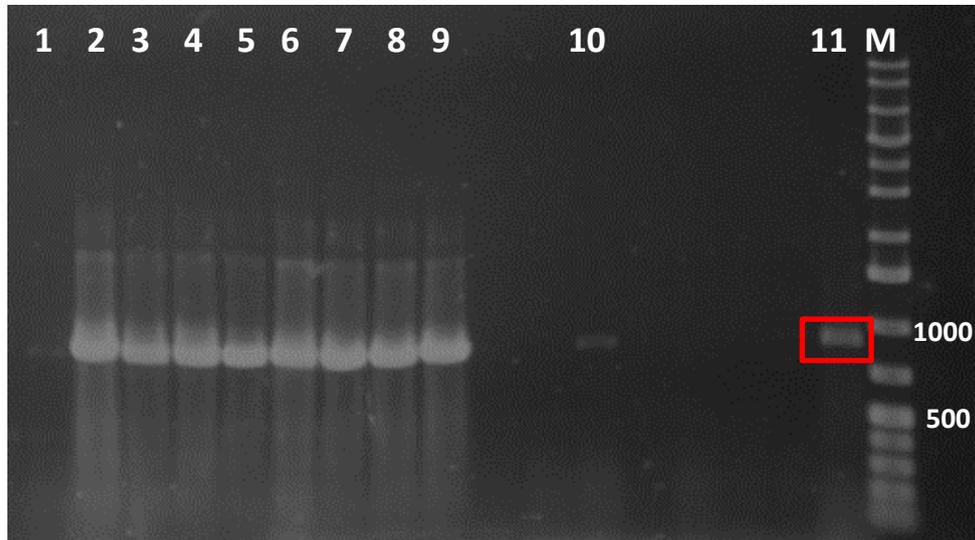


Figura 2: Productos de PCR para *int1*. Gel de Agarosa 0,8%. M, Marcador de Tamaño Molecular; 11, Recuadro en rojo, control positivo para el gen *int1*, de 892 pb Pocillos 1 al 10: aislamientos de *E. coli* positivos para la amplificación del gen *int1*.

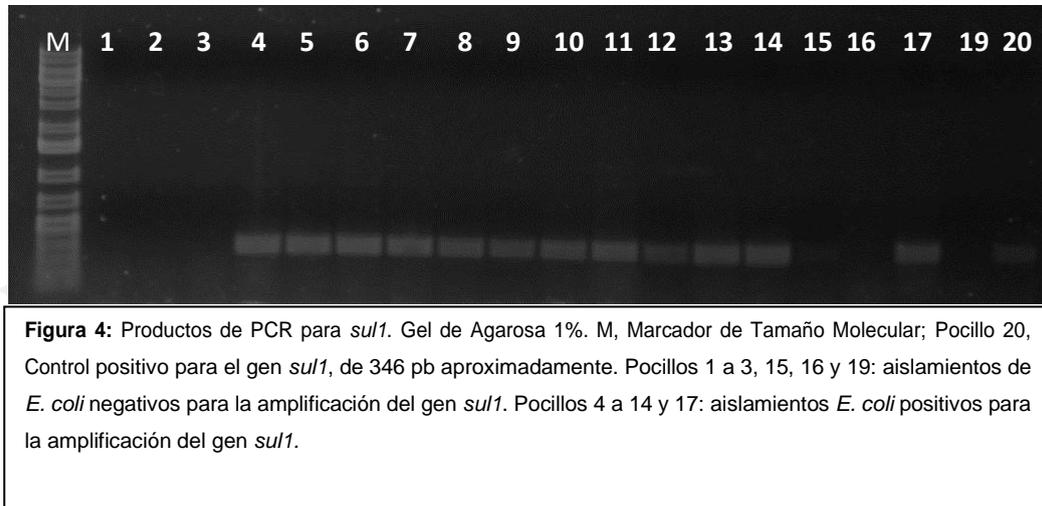
A continuación, a estos 86 aislamientos *int1*+, se les buscó y evidenció la presencia del gen *qacEΔ1* (Fig. 3), detectándose en 51/86 (59%).



Figura 3: Productos de PCR para *qacEΔ1*. Gel de Agarosa 1%. M, Marcador de Tamaño Molecular; Pocillo 1, Control positivo para el gen *qacEΔ1*, de 200 pb aproximadamente. Pocillos 2 a 4: aislamientos de *E. coli* negativos para la amplificación del gen *qacEΔ1*. Pocillos 5 a 8: aislamientos de *E. coli* positivos para la amplificación del gen *qacEΔ1*.

Siguiendo los análisis, los aislamientos *intl1+ qacEΔ1+* fueron ulteriormente analizados para detectar la presencia del gen *sul1* (Fig. 4).

De los 51 asilamientos de *E. coli intl1+ qacEΔ1+* analizados 46 fueron positivos para el gen *sul1*.



6.1 Detección de la región ISCR1 y del gen *intl2*

No se detectó la presencia de la región ISCR1 ni del gen *intl2* en ninguna de los 166 aislamientos que comprendieron este trabajo.

6.2 Amplificación de la región variable

Una vez realizados todos los PCR se determinó que 46/166 aislamientos (27,7%) presentaban el perfil *intl1+qacEΔ1+sul1+*. Debido a esto, se pudo determinar que 5 animales enfermos y 5 animales sin sintomatología de DNT presentaban el integrón clase 1 completo.

Para el estudio de las regiones variables y caracterización de los integrones se seleccionaron 12 aislamientos de *E. coli*. La selección se basó en la presencia del integrón completo (dieron positivo para los tres genes de interés) y en si los animales de donde provenían los aislamientos presentaban resistencia contra compuestos antimicrobianos, la cual fue analizada por disco difusión previamente a nuestro trabajo (Coppola et al., 2020). De ser aislamientos que no presentaban resistencias a antibióticos, se seleccionó el aislamiento primer aislamiento de cada individuo, habiendo cumplido la condición de presentar un Integrón clase 1 completo, es decir, que haya presentado el perfil *intl1+qacEΔ1+sul1+*.

Las dobles bandas observadas en el gel de agarosa (Fig. 5), tras la amplificación de la RV de los integrones tipo 1, podrían representar la presencia de dos variantes distintas de la RV en las muestras analizadas. Estas variantes podrían diferir en la cantidad y/o tipos de genes de resistencia a los antibióticos y otros genes presentes en la RV, lo que resulta en fragmentos de ADN de diferentes tamaños, como los de aproximadamente 750 y 1500 pares de bases (Fig.5).

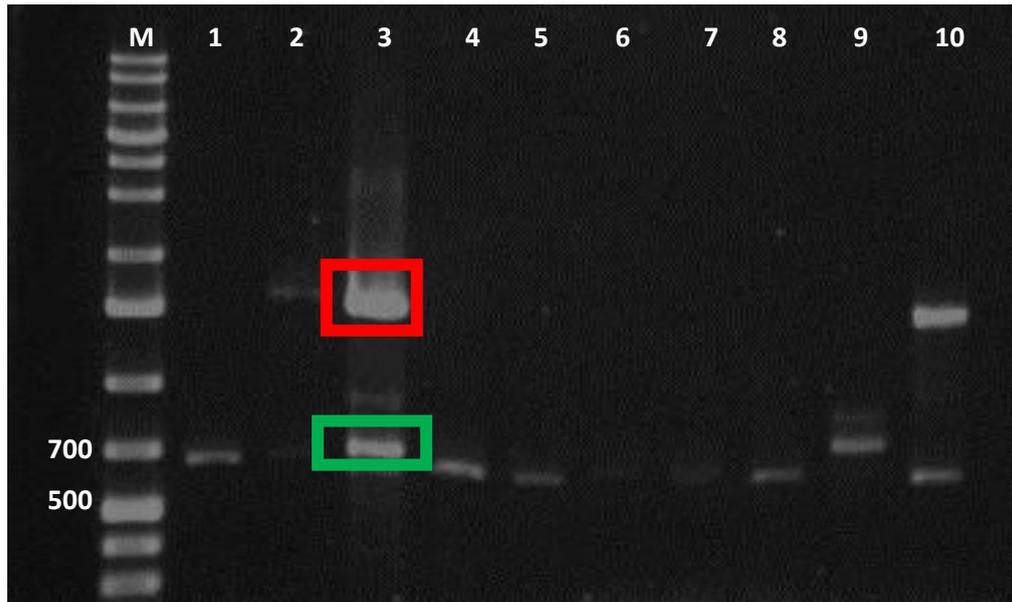


Figura 5: Productos de amplificación de las regiones variables del integrón de clase 1. Gel de agarosa al 1%. Del 1 al 10: productos de amplificación con los primers 5'CS y 3'CS. Productos amplificados de ~750pb (Recuadro en verde) y ~1500pb (Recuadro en rojo) seleccionados para amplificar; M, Marcador de Tamaño Molecular.

6.3 Secuenciación de la región variable

Se secuenciaron las regiones variables de 12 aislamientos de *E. coli* y se generaron secuencias consenso a partir de las obtenidas para cada primer utilizando el programa BioEdit (v7.1).

Las secuencias consenso de las regiones variables seleccionadas se compararon contra la base de datos del BLAST y se determinó qué genes portaban. Siete de los doce aislamientos de *E. coli* presentaron el gen *aadA*, que confiere resistencia a los antibióticos estreptomicina y espectinomicina (Fig. 6).

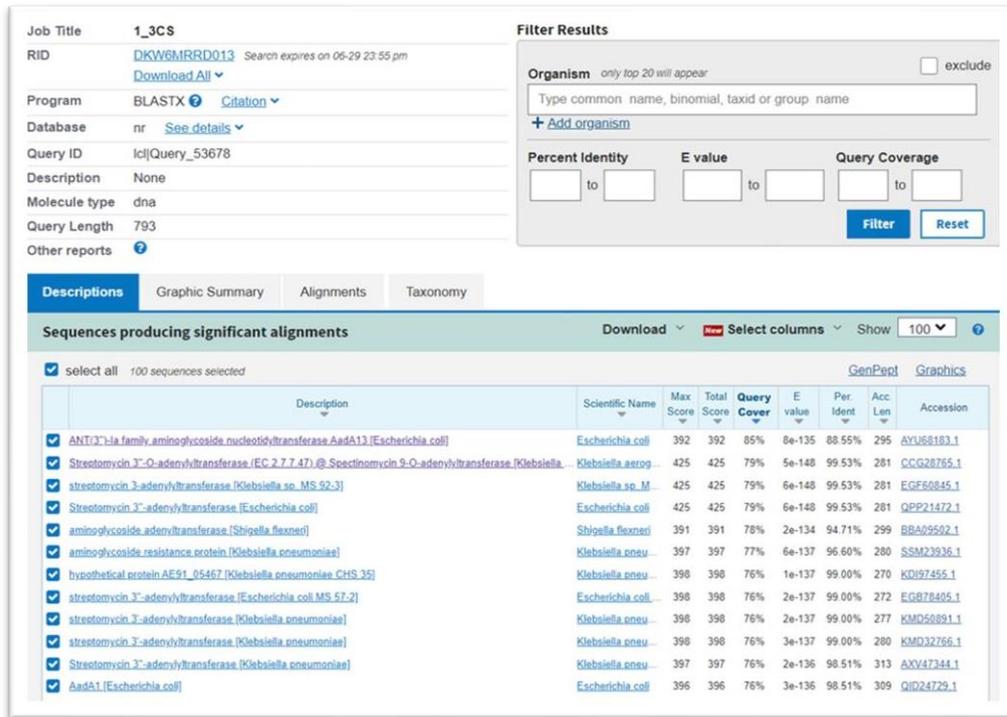


Figura 6: Captura de pantalla del resultado de BLAST de una de las regiones variables amplificadas.

Tabla 2. Aislamientos seleccionados para secuenciar su integrón de clase 1 detallando la sintomatología del animal, el perfil de resistencia a antibióticos (Coppola et al., 2020) y los genes de resistencia detectados en este trabajo.

Aislamiento	Estado	Perfil de resistencia a antibióticos	tamaño secuenciado	Genes
1	Sano	AMP	1500pb	<i>aadA</i>
2	Sano	---	1500pb	<i>aadA</i>
3	Sano	---	1500pb	<i>aadA</i>
3b	Sano	---	700pb	---
4	Sano	AMP/CN/SXT	1500pb	<i>aadA</i>
4b	Sano	AMP/CN/SXT	700pb	---
5	Sano	---	1500pb	<i>aadA</i>
6	Enfermo	---	1500pb	<i>aadA</i>
6b	Enfermo	---	700pb	---
7	Enfermo	---	1500pb	<i>aadA</i>
8	Enfermo	AMP/CXM/CIP/ENR/AK	700pb	---
9	Enfermo	AMP/CIP/ENR/SXT	1500pb	---

7. Discusión

El sistema lechero en Uruguay tiene una relevancia económica muy importante para el país debido a la gran demanda en el consumo de los productos lácteos, lo que se ha reflejado en un aumento en la producción del sector en los últimos años (DIEA, 2020). En un trabajo reciente en terneros de lechería se reportó que la tasa de mortalidad nacional perinatal y en la crianza en promedio para el año 2013-2014 fue de 7,4% y 10,8%, respectivamente (Schild, 2017), valores muy elevados si comparamos con países de la región como Argentina, pero también con Estados Unidos. Las altas tasas de mortalidad se deben principalmente a enfermedades infectocontagiosas que afectan a los animales. Los sistemas de producción ganadera se han intensificado en la última década, y en tales circunstancias, la transmisión de patógenos aumenta. Además, la mortalidad del ternero influye posteriormente al ser la futura reposición de adultos, y esto determina el correcto mantenimiento del tambo.

La DNT es reconocida mundialmente como uno de los mayores desafíos para la industria lechera por ser una de las causas más comunes de mortandad en terneros recién nacidos (Lorenz et al., 2011). Es una enfermedad multifactorial cuyos agentes etiológicos más comúnmente asociados son *E. coli*, rotavirus y coronavirus, *Cryptosporidium* spp., *Clostridium* spp., y *Salmonella* spp. (Foster & Smith, 2009; Kolenda et al., 2015).

La alta tasa de transmisión de enfermedades infectocontagiosas en los rodeos y la crisis de mortalidad de terneros ha llevado a la implementación de estrategias para asegurar la viabilidad de los animales. En este sentido, los tratamientos como la antibiototerapia se han empleado sin tener en cuenta las consecuencias que conllevan. Actualmente, se considera que el uso indiscriminado de antibióticos ha llevado al desarrollo de bacterias multirresistentes, motivo por el cual resulta sumamente relevante el estudio de la resistencia antimicrobiana y los mecanismos por los cuales se produce (Bosman et al., 2014).

E. coli se considera un importante reservorio de genes de resistencia antimicrobiana, los cuales consigue transferir mediante diversas estrategias (Kolenda et al., 2015). Dentro de los mecanismos de diseminación de genes de resistencia se destaca la THG. Dentro de los elementos genéticos móviles que utilizan este mecanismo de transferencia, los integrones de clase 1 han sido asociados a aislamientos clínicos de humanos, animales y a muestras ambientales por su capacidad de compactar casetes de genes de resistencia a antibióticos (Ahmed et al., 2007; di Conza & Gutkind, 2010; Nield et al., 2001).

Estudios previos de nuestro laboratorio han evaluado la presencia de integrones en terneros con DNT y sin síntomas de enfermedad en diversos establecimientos del país, mediante la amplificación parcial de los genes *int1* e *int2* y también los genes *qacEΔ1* y *sul1* del integrón de clase 1. En este trabajo se seleccionaron 20 individuos y se determinó por PCR que 10 de

ellos fueron *intl1*, *qacEΔ1* y *sul1* positivos, lo cual confirmaría la presencia de ambos extremos del integrón de clase 1 (Umpiérrez et al., 2017). Considerando que 5 de los aislamientos donde se determinó la presencia de los genes asociados al integrón de clase 1 corresponden a terneros enfermos, los resultados no serían concluyentes respecto a la influencia del integrón en la patología, sin embargo, el que estuviera presente en el 50% de los casos amerita a realizar más estudios, ya que podría sugerir que la presencia del integrón de clase 1 podría formar parte del amplio repertorio de mecanismos que le confieren a *E. coli* la resistencia antimicrobiana en los casos de DNT.

En el presente trabajo, utilizando muestras de heces de terneros enfermos y asintomáticos de un tambo de San José se evaluó la presencia del gen de la integrasa clase 1 (*intl1*) y la integrasa clase 2 (*intl2*) presentes en la región conservada 5' de los integrones clase 1 y 2, y los genes *qacEΔ1* y *sul1* presentes en la región 3' del integrón de clase 1. Así como también, se estudió la presencia de la secuencia *ISCR1* en aquellos aislamientos que presentan el gen *intl1*. En los casos donde se detectaron estos genes se amplificaron y secuenciaron las RV de los integrones y se analizaron mediante herramientas bioinformáticas. Los resultados de este trabajo determinaron la presencia del gen *intl1* en 52% de los aislamientos analizados, dentro de los cuales 59% fueron positivas para *qacEΔ1* y de éstos, 90% para *sul1*. Se demostró la presencia de ambos extremos del integrón de clase 1 en los aislamientos que contienen los tres genes estudiados. Considerando que la presencia del integrón se detectó en la misma proporción en terneros sanos y en terneros con DNT, estos resultados no son concluyentes respecto a la causalidad de la presencia del integrón de clase 1 y la DNT.

La región *ISCR1* y el Integrón de clase 1 se han reportado previamente asociados entre sí. Se ha propuesto que *ISCR1* posee una actividad regulatoria en el reclutamiento génico y su presencia influiría en el reclutamiento de genes de resistencia en el integrón de clase 1 (Di Conza & Gutkind, 2010). Sin embargo, en nuestro trabajo no se detectó en ninguna de los aislamientos estudiados. Por otro lado, no se detectó la presencia del gen *intl2* para ninguno de los 166 aislamientos de *E. coli*. Este resultado es acorde a reportes previos donde se obtuvieron resultados similares para este tipo de integron (Umpiérrez et al., 2017).

Considerando que hay casetes de genes ubicados en la RV del integrón, en este trabajo se propuso amplificar y secuenciar la RV de 12 aislamientos de *E. coli*. Se determinó que 7/12 aislamientos de *E. coli* presentaron el gen *aadA*, el cual confiere resistencia a los antibióticos estreptomina y espectinomicina. Resultados similares fueron reportados por Naderi y colaboradores (2016), quienes determinaron que el gen *aadA* era uno de los más frecuentes en aislamientos de *E. coli* de terneros con diarrea. Por otro lado, en el trabajo previo realizado Coppola y colaboradores (2020), a partir de los aislamientos de nuestro trabajo, en consecuencia, las mismas cepas, se determinó la presencia de un fenotipo de resistencia a los aminoglucósidos AK y CN, aunque no así para STR (no fue evaluado) (Coppola et al.,

2020). Asimismo, es importante resaltar que existen productos comerciales a la venta en Uruguay para tratar infecciones intestinales en terneros jóvenes, los cuales contienen una combinación de antibióticos y vitaminas, incluyendo antibióticos de la familia de los aminoglucósidos. La aplicación de estos productos podría estar relacionada con la presencia de genes de resistencia a dicho antibiótico en los aislamientos analizados, tanto en terneros enfermos como sanos. Estudios más detallados, aumentando el número de aislamientos y animales deberían realizarse para corroborar los resultados obtenidos.

8. Conclusiones

El integrón de clase 1, con el gen *aadA* de resistencia a estreptomicina y espectinomicina en su RV, está presente tanto en aislamientos de *E. coli* de terneros enfermos como de asintomáticos del tambo de San José.

No se encontraron diferencias respecto a la presencia del integrón en animales asintomáticos y enfermos.

Sería relevante realizar un estudio controlado donde se verifique si el tambo a estudiar se administran productos con aminoglucósidos y bajo qué condiciones médicas se aplican para determinar si su aplicación aumenta la ocurrencia de resistencia a dicho antibióticos y la presencia del Integrón de clase 1 portando los genes que lo codifican.

Hasta el momento, en este muestreo, no se ha encontrado el integrón de clase 2, por lo que no sería un mecanismo que influya en la transferencia de resistencia entre aislamientos de *E. coli* patógenas de terneros.

9. Perspectivas

El presente estudio fue realizado exclusivamente para un rodeo del departamento de San José, expandir el área de muestreo a otros establecimientos y de otras localidades nos permitirá realizar un abordaje más a fondo de estas estructuras genéticas y de cómo ha variado la presencia del Integrón de clase 1 en el tiempo. Para complementar este análisis, se podría estudiar la diversidad genética de las cepas de *E. coli*, realizar un seguimiento longitudinal de los cambios en las resistencias y examinar la influencia de factores ambientales en la propagación de la resistencia a los antibióticos.

En el Depto. de Microbiología del IIBCE se cuenta con aislamientos de *E. coli* de terneros sanos y con DNT de 30 tambos de Uruguay, procesados entre 2016 y 2018 simultáneamente incluyendo los aislamientos utilizados en este trabajo (Umpiérrez et al., 2021), los cuales

podrían utilizarse para ampliar el estudio de los integrones. Asimismo, detectar las resistencias presentes en los establecimientos resulta de gran importancia, ya que podría mostrar una distribución de las mismas en el territorio, para evaluar si existe una correlación con los antibióticos utilizados.

10. Bibliografía

- Ahmed, A. M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y., & Shimamoto, T. (2007). Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6686-6690. <https://doi.org/10.1128/AEM.01054-07>
- Anuario estadístico agropecuario 2021, Dirección de estadística agropecuaria (DIEA). (s. f.).
- Arenz, S., & Wilson, D. N. (2016). Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025361>
- Bado, I., Cordeiro, N. F., Robino, L., García-Fulgueiras, V., Seija, V., Bazet, C., Gutkind, G., Ayala, J. A., & Vignoli, R. (2010). Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum β -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(5), 453-458. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.042>
- Bazeley, K. (2003). Investigation of diarrhoea in the neonatal calf. *In Practice*, 25(3), 152-159. <https://doi.org/10.1136/inpract.25.3.152>
- Bennett, N. et al. (2017). *Plan Nacional de contención de Resistencia Antimicrobiana de Uruguay*.
- Bosman, A. B., Wagenaar, J. A., Stegeman, J. A., Vernooij, J. C. M., & Mevius, D. J. (2014). Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* in veal calves is associated with antimicrobial drug use. *Epidemiology and Infection*, 142(9), 1893-1904. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002665>
- Cambray, G., Guerout, A.-M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 141-166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>
- Carter, H. S. M., Renaud, D. L., Steele, M. A., Fischer-Tlustos, A. J., & Costa, J. H. C. (2021). A narrative review on the unexplored potential of colostrum as a preventative treatment and therapy for diarrhea in neonatal dairy calves. *Animals*, 11(8), 1-15. <https://doi.org/10.3390/ani11082221>
- Chase, C. C. L., Hurley, D. J., & Reber, A. J. (2008). Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 24(1), 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.11.001>
- Constable, P. D. (2003). Use of antibiotics to prevent calf diarrhea and septicemia. *Bovine Practitioner*, 37(2), 137-142.
- Constable, P. D. (2004). Antimicrobial Use in the Treatment of Calf Diarrhea Change in Small Intestinal Bacterial Flora in Calves with Diarrhea. *J Vet Intern Med*, 18, 8-17.
- Constable, P. D. (2004). Treatment of Calf Diarrhea: Antimicrobial and Ancillary Treatments. *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice*, 25(1), 101-120 <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.012>
- Constable et al., (2017). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats - two-volume set*. ISBN: 9780-7020-5246-8.
- Coppola, N., Freire, B., Umpiérrez, A., Cordeiro, N. F., Ávila, P., Trenchi, G., Castro, G., Casaux, M. L., Fraga, M., Zunino, P., Bado, I., & Vignoli, R. (2020). Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in

Escherichia coli Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.588919>

- Crouch, C. F., Oliver, S., & Francis, M. J. (2001). Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99). *Veterinary Record*, 149(4), 105-108. <https://doi.org/10.1136/vr.149.4.105>
- Cury, J., Jové, T., Touchon, M., Néron, B., & Rocha, E. P. (2016). Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 44(10), 4539-4550. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw319>
- De, E., Tasa, L. A., Mortalidad, D. E., De, A., & Schild, C. (2017). *UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE VETERINARIA Programa de Posgrados*.
- di Conza, J. A., & Gutkind, G. O. (2010). integrones: Los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(1), 63-78.
- Ebner, P., Garner, K., & Mathew, A. (2004). Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island SG11 in *Salmonella enterica* var. *Meleagridis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 1004-1009. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh192>
- Fecteau, G., Smith, B. P., & George, L. W. (2009). Septicemia and Meningitis in the Newborn Calf. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25(1), 195-208. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.004>
- Foster, D. M., & Smith, G. W. (2009). Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25(1), 13-36. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.013>
- Godden, S., Lombard, J., & Woolums, A. (2020). Sin hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information website . *Diabetes Metab Syndr.*, 14(4)(January), 337-3.
- Gonzalez, R., Elvira, L., Carbonell, C., Vertenten, G., & Fraile, L. (2021). The specific immune response after vaccination against neonatal calf diarrhoea differs between apparent similar vaccines in a case study. *Animals*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/ani11051238>
- Griffin, D., Chengappa, M. M., Kuszak, J., & McVey, D. S. (2010). Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(2), 381-394. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.004>
- Gulliksen, S. M., Jor, E., Lie, K. I., Hamnes, I. S., Løken, T., Åkerstedt, J., & Østerås, O. (2009). Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 5057-5066. 09-2080. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2080>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x>
- Kolenda, R., Burdukiewicz, M., & Schierack, P. (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00023>
- Levison, M. E., & Levison, J. H. (2009). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of

Antibacterial Agents. En *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 23, Issue 4, pp. 791-815). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.008>

- Lorenz, I., Fagan, J., & More, S. J. (2011). Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Irish Veterinary Journal*, 64(1), 9. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-64-9>
- Louge Uriarte, E. L., González Pasayo, R. A., Massó, M., Carrera Paez, L., Domínguez Moncla, M., Donis, N., Malena, R., Méndez, A., Morrell, E., Giannitti, F., Armendano, J. I., Faverin, C., Centrón, D., Parreño, V., Odeón, A. C., Quiroga, M. P., & Moreira, A. R. (2022). Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* of the phylogroups A and C in dairy calves with meningitis and septicemia. *Microbial Pathogenesis*, 163(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105378>
- Marcé, C., Guatteo, R., Bareille, N., & Fourichon, C. (2010). Dairy calf housing systems across Europe and risk for calf infectious diseases. *Animal*, 4(9), 1588-1596. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000650>
- Margueritte, J., Mattion, N., Blackhall, J., Fernández, F., Parreño, V., Vagnozzi, A., Odeón, A., & Combessies, G. (2007). Diarrea Neonatal En Terneros De Rodeos De Cría: Su Prevención Y Tratamiento. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1, 3.
- Mazel, D. (2006). Integrons: Agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 608-620. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1462>
- Mehinagic, K., Pilo, P., Vidondo, B., & Stokar-Regenscheit, N. (2019). Coinfection of Swiss cattle with bovine parainfluenza virus 3 and *Mycoplasma bovis* at acute and chronic stages of bovine respiratory disease complex. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(5), 674-680. <https://doi.org/10.1177/1040638719861686>
- Naderi, Z., Ghanbarpour, R., & Sami, M. (2016). Antimicrobial Resistance Characteristics and Phylogenetic Groups of *Escherichia coli* Isolated From Diarrheic Calves in Southeast of Iran. *International Journal of Enteric Pathogens*, 4(4), 21-27. <https://doi.org/10.15171/ijep.2016.15>
- Nield, B. S., Holmes, A. J., Gillings, M. R., Recchia, G. D., Mabbutt, B. C., Nevalainen, K. M. H., & Stokes, H. W. (2001). Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), 59-65. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00546-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00546-2)
- Orman, B. E., Piñeiro, S. A., Arduino, S., Galas, M., Melano, R., Caffer, M. I., Sordelli, D. O., & Centrón, D. (2002). Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), 3963-3970. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3963-3970.2002>
- Partridge, S. R., & Hall, R. M. (2003). In34, a complex In5 family class 1 integron containing orf513 and dfrA10. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 342-349. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.342-349.2003>
- Poey, M. E., Azpiroz, M. F., & Laviña, M. (2019). Microbial Pathogenesis On sulfonamide resistance, sul genes , class 1 integrons and their horizontal transfer in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 135(April), 103611. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103611>
- Poey, M. E., & Laviña, M. (2018). Horizontal transfer of class 1 integrons from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* K12. *Microbial Pathogenesis*, 117(February), 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.006>

- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Power, P., Galleni, M., Di Conza, J., Ayala, J. A., & Gutkind, G. (2005). Description of In116, the first blaCTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(4), 461-465. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh556>
- Recca, A., Calvo, E., Crouch, C. F., Navetat, H., Rizet, C., Guijarro, R., Perez-Garcia, J., & Francis, M. J. (2003). Comparative lactogenic antibody responses of cattle from European field trials with a new enteric disease vaccine. *Veterinary Record*, 152(24), 751-752. <https://doi.org/10.1136/vr.152.24.751>
- Rosser, S. J., & Young, H. K. (1999). Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(1), 11-18. <https://doi.org/10.1093/jac/44.1.11>
- Rui, Y., Lu, W., Li, S., Cheng, C., Sun, J., & Yang, Q. (2018). Integrons and insertion sequence common region 1 (ISCR1) of carbapenem-non-susceptible Gram-negative bacilli in fecal specimens from 5000 patients in southern China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(5), 571-576. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.06.015>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., & Walsh, T. R. (2006a). Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(1), 1-6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl204>
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., & Walsh, T. R. (2006b). ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 296-316. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00048-05>
- Umpiérrez, A. (2016). *Identificación y caracterización de Escherichia coli asociada a la Diarrea Neonatal de Terneros en Uruguay*. 136. Tesis doctorado, UdelaR.
- Umpiérrez, A., Bado, I., Oliver, M., Acquistapace, S., Etcheverría, A., Padola, N. L., Vignoli, R., & Zunino, P. (2017). Zoonotic potential and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in neonatal calves in Uruguay. *Microbes and Environments*, 32(3), 275-282. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17046>
- Umpiérrez, A., Ernst, D., Fernández, M., Oliver, M., Casaux, M. L., Caffarena, R. D., Schild, C., Giannitti, F., Fraga, M., & Zunino, P. (2021). Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. *Revista Argentina de Microbiología*, xx. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.004>
- Umpiérrez, A., Ernst, D., Cardozo, A., Torres, A., Fernández, M., Fraga, M., Vignoli, R., Bado, I., Vidal, R., & Zunino, P. (2022). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with potential harmful profiles to humans are isolated from the faeces of calves in Uruguay. En *Austral J Vet Sci* (Vol. 54).
- World Health Organization (WHO). (2017). Global action plan on antimicrobial resistance. *World Health Organization*, 1-28.

Zhang, A. N., Li, L.-G., Ma, L., Gillings, M. R., Tiedje, J. M., & Zhang, T. (2018). Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class 1 integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection. *Microbiome*, 6(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0516-2>

Žuffa, T., Durel, L., Hraška, V., Svitačová, D., Reyneke, R., & Šťastný, P. (2019). Immune Response and Efficacy of a New Calf Scour Vaccine Injected Once during the last Trimester of Gestation. *Concept in Dairy and Veterinary Science*, 2(5), 266-271. <https://doi.org/10.32474/CDVS.2019.03.000153>