

## Artículo original

# Prevalencia de genes *qnr* en bacterias gramnegativas provenientes de fuentes humana, animal y aguas residuales, en Cumaná, estado Sucre, Venezuela

Lorena Abadía-Patiño<sup>a,\*</sup>, Liliana Galia<sup>b</sup>, Martina Bacchi<sup>b</sup>, Giuseppe Cornaglia<sup>b</sup>, Annarita Mazzariol<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Resistencia Bacteriana, Departamento de Biomedicina del IIBCAUDO, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

<sup>b</sup>Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Università di Verona, Italia.

Recibido 11 de marzo de 2018; aceptado 21 de noviembre de 2018

**Resumen:** La presencia de bacterias resistentes a las fluoroquinolonas en la comunidad, sugiere una fuerte presión selectiva de estos antibióticos fuera de los centros de salud. El objetivo de este trabajo fue detectar los marcadores moleculares *qnr* en cepas de diferentes ambientes para determinar el impacto del abuso de las fluoroquinolonas en Cumaná. En el año 2014, se aislaron bacterias de diferentes orígenes (aguas residuales, tracto intestinal de animales y humanos) siendo *Escherichia coli* la principal especie en todas las fuentes. Se determinó la CMI a ciprofloxacina y se buscaron los genes de resistencia *qnr* en las 42 cepas aisladas. Las cepas presentaron un amplio rango en las CMI a ciprofloxacina (0,25 –  $\geq$ 128 mg/L). El principal determinante de resistencia a fluoroquinolonas fue *qnrA* (64%) en cepas de todas las fuentes. Este es el primer trabajo en Venezuela que detecta dos genes *qnr* diferentes en la misma cepa (nueve cepas en total), así como es el primer reporte mundial de cepas de *Citrobacter farmeri* que albergan el gen *qnrA*.

**Palabras clave:** gramnegativos; resistencia a fluoroquinolonas; aguas residuales; animales; humanos; gen *qnr*.

## Prevalence of *qnr* genes in gramnegative bacteria from human, animal and sewage sources, in Cumaná, Sucre state, Venezuela

**Abstract:** The presence of bacteria resistant to fluoroquinolones in the community, suggests a strong selective pressure on these antibiotics outside health facilities. The objective of this work was to detect the *qnr* molecular markers in bacterial strains from different environments to determine the impact of fluoroquinolone abuse in Cumaná. In 2014, bacteria of different origins (sewage, intestinal tract of animals and humans) were isolated, with *Escherichia coli* being the main species in all sources. The MIC was determined for ciprofloxacin and the *qnr* resistance genes were searched on 42 isolates. Strains presented a wide range of MICs for ciprofloxacin (0.25 –  $\geq$  128 mg/L). The main fluoroquinolone determinant of resistance was *qnrA* (64%) in isolates from all sources. This is the first work in Venezuela that detects two different *qnr* genes in the same strain (nine strains in total), as well as being the first worldwide report for isolates of *Citrobacter farmeri* that harbor the *qnrA* gene.

**Keywords:** gramnegative; fluoroquinolones resistance; sewage; animals; humans; *qnr* genes.

\* Correspondencia:

E-mail: labadia@udo.edu.ve

### Introducción

El principal mecanismo conocido de resistencia a las quinolonas, es la mutación a nivel cromosómico, en los genes que codifican las topoisomerasas. Los genes de ambas topoisomerasas (girasa y topoisomerasa IV), tienen secuencias particulares, las cuales han sido denominadas QRDR, que por sus siglas en inglés significan: región determinante de la resistencia a quinolonas [1]. Las fluoroquinolonas deben atravesar la pared de las bacterias

para alcanzar su blanco; por lo tanto la permeabilidad de la pared es importante para que las fluoroquinolonas puedan actuar, de tal manera que, otro mecanismo de resistencia contra este grupo de antimicrobianos son las mutaciones en los genes que codifican para el lipopolisacárido (LPS), que aumentan la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las bacterias con respecto a las fluoroquinolonas hidrofóbicas, como ácido nalidíxico, no así en las hidrofílicas, como ciprofloxacina y norfloxacina [2]. Las bacterias tienen bombas de eflujo que sacan del interior de la célula

sustancias tóxicas, pero al mismo tiempo sacan antibióticos y las fluoroquinolonas no escapan a estas bombas de eflujo, las cuales disminuyen su acumulación intracelular [3].

A finales de la década de los 90, se descubrió un nuevo mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas, mediado por plásmidos, los cuales transportan genes *qnr* [4]. Hasta el momento hay descritas cinco tipos de proteínas (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD). La primera especie aislada con este mecanismo fue *Klesiella pneumoniae* [5]; actualmente este mecanismo está distribuido en los diferentes géneros de las enterobacterias y otros gramnegativos como *Shewanella* en el mundo entero [6]. Lo interesante es que se han detectado genes *qnr* no solo en plásmidos, sino en el cromosoma de algunas bacterias, demostrando su origen ambiental [7]. QnrA, así como las otras proteínas Qnr descritas, se encargan de interferir en la formación del complejo ADN-girasa o topoisomerasa IV-quinolona, para prevenir el efecto de la quinolona en la duplicación y transcripción del ADN. De esta forma, protege a la bacteria del efecto bactericida de las quinolonas al inhibir la síntesis de su material genético [4].

Las bacterias que transportan plásmidos con genes *qnr* se diseminan más fácilmente porque otorgan baja CMI a fluoroquinolonas, aumentando el nivel de resistencia de las bacterias con mecanismos de resistencia asociados. Para ciprofloxacina, la ventana de selección de mutantes va de 0,2 a 1,25 mg/L. La droga libre en suero, es decir, la que no se une a las proteínas, es de 1,8 mg/L; vale resaltar que ciprofloxacina no llegará a todos los tejidos a esa concentración. Las bacterias que estén expuestas a concentraciones menores, son las que van a desarrollar mutaciones o a seleccionar los plásmidos que albergan genes *qnr* [8]. La contaminación ambiental por ingredientes farmacológicamente activos de medicamentos, ha sido documentada en los últimos años [9]. Se estima que estos residuos de medicamentos vienen de los centros de salud y los hogares, pero también hay una cantidad importante que es descartada al ambiente por las industrias farmacéuticas en sus sistemas de desagües, producto de residuos de la fabricación de los medicamentos [10]. En vista de que estos mecanismos de diseminación plasmídica son un problema para la salud, se decidió valorar la presencia de estos determinantes de resistencia en cepas de origen ambiental (aguas residuales y animales) y el hombre, para determinar el impacto del abuso de las fluoroquinolonas en Cumaná.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio experimental donde se analizaron muestras de aguas residuales, heces humanas e hisopados rectales de pollos, cerdos y perros para buscar la presencia de genes *qnr*.

**Población y muestra:** Las muestras de aguas residuales fueron obtenidas mediante hisopos de algodón sumergidos en las mismas. La recolección se realizó en diferentes puntos de la ciudad, a saber: zona industrial San Luís, barrio

“El Bolivariano”, conjunto residencial “Los Roques”, Av. Panamericana, urbanización “Los Chaguaramos”, población de Campeche, Av. Principal de las Palomas, urbanización Cumaná III, Defensa Civil, calle Mariño, barrio Brasil Sur, entrada principal del barrio la Llanada y predios del Mercado Municipal. Los hisopos fueron colocados en medio de transporte Stuart. Así mismo, se tomaron muestras de hisopados rectales de 15 pollos de una granja avícola ubicada en las afueras de la ciudad de Cumaná, 6 cerdos (criador minorista) y 5 perros callejeros presentes en el recinto del Decanato del Núcleo Sucre de la Universidad de Oriente. Las muestras de heces de humanos fueron tomadas con hisopos de los recolectores de heces dejados en los laboratorios del ambulatorio de la Llanada (9), y del Hospital “Dr. Julio Rodríguez” (15), con el consentimiento informado de los pacientes. El período de estudio estuvo comprendido entre 12 de mayo y el 7 de julio de 2014.

**Aislamiento de las cepas de estudio:** Los hisopados fueron inoculados en agar MacConkey (BD DIFCO™), suplementado con ciprofloxacina (16 mg/L), e incubadas durante 18 h a 35 °C. Por cada muestra se seleccionaron tres colonias lactosa positivas y tres lactosa negativas, con la misma morfología. Se les realizó la coloración de Gram y se guardaron a -20 °C en BHI + glicerol 20% en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana del IIBCAUDO. Los aislados fueron identificados por MALDI-TOF (Vitek MS, Biomerieux) en abril de 2015, en el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad de los Estudios de Verona, Italia.

**Determinación de la CMI a ciprofloxacina por el método de dilución en caldo:** Se determinó la CMI a ciprofloxacina, por el método de dilución en caldo Müeller-Hinton, según normas del manual M100-S24 [11], en el laboratorio de Bacteriología de la Universidad de los Estudios de Verona.

**Determinación de los genes *qnr* mediante reacción en cadena de la polimerasa:** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en el laboratorio de Bacteriología de la Universidad de los Estudios de Verona, con 200 ng de ADN, 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa, 0,5 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTP, 2,5 mM de buffer ajustado con magnesio y cantidad suficiente de agua destilada estéril para completar un volumen final de 50 µl de reacción. En cada PCR se colocaron tubos controles positivos y negativos para los *qnr* (con ADN de cada *qnr* descrito y sin ADN) [12]. Se realizó una PCR múltiple, para detectar los genes *qnrA* (516 pb), *qnrB* (469 pb) y *qnrS* (417 pb) [13]. Se hizo una PCR simple para amplificar el gen *qnrC* (447 pb) [14] y otra para el gen *qnrD* (644 pb) [15].

## Resultados y discusión

En 2005 se prohibió en Venezuela la venta de quinolonas sin prescripción facultativa, así como la de otros antibióticos (cefalosporinas de tercera generación,

macrólidos y ansamicinas). Sin embargo, después de la aparición de la Gaceta Oficial N° 38348 resolución N° 604, se ha incrementado la venta de fluoroquinolonas en Venezuela, lo cual hace pensar que el número de bacterias resistentes a este antibiótico, en la comunidad, también ha aumentado [16]. Por lo que se buscaron muestras de diferentes orígenes para establecer el impacto del uso de fluoroquinolonas en el ambiente y en la comunidad (humano y animal) en la Ciudad de Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Está bien documentado que el problema de la diseminación de los mecanismos de resistencia bacteriana ocurre entre los sectores ambiental, humano y animal [17]. Las fluoroquinolonas no se metabolizan por completo en los humanos, es así que llegan grandes cantidades de antibióticos en su forma activa al ambiente, favoreciendo la selección no solo de bacterias resistentes sino de genes de resistencia en elementos genéticos móviles [18]. Una vez los antibióticos llegan a los diferentes ecosistemas, van a ejercer una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas presentes [19]. En este estudio, se obtuvieron 24 cepas de animales, 10 de aguas residuales y 8 de humanos (Tabla 1); se conservaron 42 bacterias en total; la principal especie aislada fue *Escherichia coli* (28). En la única muestra donde se aislaron bacilos gramnegativos no fermentadores (3) fue en aguas residuales. Los sitios de aguas residuales que resultaron positivos para el aislamiento de bacterias resistentes, resultaron ser de sectores populares (Barrios Bolivariano, Brasil, las Palomas y la Llanada), además del Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná (Datos no mostrados). El manejo de las aguas residuales (fuente humana) y desperdicios animales, son esenciales para disminuir la carga ambiental de bacterias resistentes a los antibióticos que pueden ser la fuente de infecciones bacterianas intratables [20].

Como se puede apreciar en la tabla 1, las cepas tienen un rango de CMI a ciprofloxacina de 0,25 a >128 mg/L. La mayoría de las cepas tienen CMI de 32 mg/L (21%). En la tabla 2 se puede observar que el principal gen *qnr* detectado fue *qnrA* (64%) y se encontró no solo en *E. coli* sino en otras enterobacterias. Los genes sucesivos fueron *qnrD* (17%), *qnrC* (11%), *qnrB* (4%), *qnrS* (4%). De igual modo, hay cepas en las cuales no se amplificó ningún gen *qnr* (19%). Se sabe que la resistencia a las fluoroquinolonas puede deberse a mutaciones en las topoisomerasas [1], AAC(6')-Ib-cr [4], bombas de eflujo QepA [21], ninguno de estos mecanismos fue buscado en este trabajo. También se observó, cómo las cepas 8B5 (*K. pneumoniae*), 8C1 (*E. coli*), 8G1 (*E. coli*), 8G2 (*K. pneumoniae*), 8H6 (*E. coli*), 9B5 (*E. coli*), 9B9 (*E. coli*), 8E7 (*Citrobacter farmeri*) tienen CMI entre 0,25 y 2 mg/L y albergan genes *qnr*. Estas cepas con nivel disminuido de sensibilidad a las fluoroquinolonas probablemente no tienen otros determinantes de resistencia y son aquellas que a nivel humano permiten una difusión de estos mecanismos de resistencia plasmídicos.

Las cepas *E. coli* 9C3 y *Enterobacter cloacae* 8G9 fueron aisladas de la misma paciente de 40 años y se observó que la cepa *E. coli* 9C3 alberga el gen *qnrD*, mientras que la cepa

Tabla 1. Genes *qnr* amplificados en enterobacterias y no fermentadores de diferentes orígenes y sus CMI a ciprofloxacina (mg/L), en Cumaná, estado Sucre, Venezuela

Código	Especie	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	CIP	Origen
6G6	<i>E. coli</i>				+		128	AR
6G10	<i>K. pneumoniae</i>	+					16	AR
8A6	<i>P. aeruginosa</i>	+		+			2	AR
8B5	<i>K. pneumoniae</i>	+					1	AR
8B7	<i>S. maltophilia</i>						4	AR
8B8	<i>S. maltophilia</i>						32	AR
8C1	<i>E. coli</i>	+					1	AR
9C4	<i>E. coli</i>	+					64	AR
8C9	<i>E. coli</i>						32	AR
9C8	<i>C. farmeri</i>	+					64	AR
8F7	<i>E. cloacae</i>	+	+				128	Cerdo
8F8	<i>E. coli</i>				+		64	Cerdo
8F2	<i>E. coli</i>						32	Cerdo
8F10	<i>E. coli</i>	+					128	Cerdo
8G1	<i>E. coli</i>	+					0,25	Cerdo
8G2	<i>K. pneumoniae</i>	+					2	Cerdo
8G5	<i>E. coli</i>	+				+	64	Cerdo
8G6	<i>E. cloacae</i>	+					128	Perro
8G7	<i>E. cloacae</i>					+	16	Perro
8G8	<i>E. coli</i>	+					>128	Perro
8H2	<i>E. coli</i>						>128	Perro
8H3	<i>E. coli</i>					+	128	Perro
8H4	<i>E. coli</i>	+				+	16	Perro
8H6	<i>E. coli</i>	+					0,25	Perro
8H7	<i>E. coli</i>	+					8	Perro
9B2	<i>E. coli</i>					+	64	Pollo
9B4	<i>E. cloacae</i>	+	+				32	Pollo
9B5	<i>E. coli</i>	+					1	Pollo
9B6	<i>E. coli</i>	+				+	32	Pollo
9B7	<i>E. coli</i>	+					32	Pollo
9B8	<i>E. coli</i>	+					32	Pollo
9B9	<i>E. coli</i>	+					0,5	Pollo
9B10	<i>E. coli</i>	+					64	Pollo
9C1	<i>E. coli</i>		+		+		32	Pollo
9C3	<i>E. coli</i>					+	>128	Humano
8E7	<i>C. farmeri</i>	+					0,5	Humano
8H5	<i>E. cloacae</i>	+			+		128	Humano
8G9	<i>E. cloacae</i>	+					32	Humano
8G10	<i>E. coli</i>						>128	Humano
8G4	<i>E. coli</i>	+				+	64	Humano
8F9	<i>E. coli</i>						16	Humano
9C7	<i>E. coli</i>						64	Humano

CIP: CMI a ciprofloxacina. AR: aguas residuales

*E. cloacae* 8G9 alberga el gen *qnrA*. Un caso parecido fue el de otra paciente femenina de 32 años, a quien se le aislaron

Tabla 2. Prevalencia de genes *qnr* detectados en enterobacterias y no fermentadores de diferentes orígenes en Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Especie	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	Prevalencia (%)
<i>E. coli</i>	16		1	2	7	22/28= 79
<i>K. pneumoniae</i>	2					2/2= 100
<i>E. cloacae</i>	5	2		2		6/6= 100
<i>C. farmeri</i>	2					2/2= 100
<i>P. aeruginosa</i>	1		1			1/1= 100

\*La prevalencia se determinó en el número de cepas que portaban los genes *qnr*, no en el número de genes *qnr* que portaban las bacterias.

dos cepas de *E. coli*, 8G4 y 8F9; en la segunda no presentó gen *qnr* mientras que en la primera se encontró el gen *qnrA*. En este trabajo no se aislaron cepas de *Salmonella*, sin embargo, hay reportes en Venezuela, que demuestran que cepas de *S. enterica* tanto de origen humano (niños) como animal (carne de pollo), son portadoras de *qnrB* y con CMI a ciprofloxacina de 0,015 a 2 mg/L [18,23]. En un estudio realizado con muestras de agua provenientes de India y Suecia, no se aislaron genes *qnrA* ni *qnrC* [18]. En este estudio se amplificó el gen *qnrC* en una sola muestra de aguas residuales y el más abundante en aguas residuales fue *qnrA* (14%) (Tabla 3). Los contaminantes de residuos de antibióticos que van directamente a las aguas de las plantas de tratamiento, son absorbidos por las partículas de sedimentos presentes [24]. El problema crece, cuando esos sedimentos se usan como abonos en la industria agroalimentaria, pues al ser ricos en materia orgánica, aportan nutrientes a las plantas que consumimos en la dieta diaria [18].

En este estudio se pudieron observar bacterias que portaban dos genes *qnr* de forma simultánea. Estos casos se visualizan en la tabla 1 y corresponden a las bacterias 8A6 (aguas residuales), 8F7, 8G5 (cerdos), 8H4 (perro), 9B4, 9B6, 9C1 (pollos), 8H5 y 8G4 (humanos). Las cepas 8F7 (*qnrA*, *qnrB*), 9B4 (*qnrA*, *qnrB*), y 8H5 (*qnrA*, *qnrC*) son *E. cloacae*, todas de diferentes orígenes. En un estudio realizado en Chongqing, China, también se describieron cepas de *E. cloacae* que albergaban dos tipos y hasta tres tipos de genes *qnr* [25]. Así como en Cumaná se obtuvieron muestras con dos tipos de genes *qnr* (21%), en India se reportó 76% de

Tabla 3. Prevalencia de genes *qnr* según procedencia de la muestra en Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Procedencia	Genes <i>qnr</i>					Prevalencia (%)
	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	
Aguas residuales	6		1	1		7/10= 70
Animal	17	3	1	2	5	22/24= 92
Humano	4			1	2	5/7= 71

\*La prevalencia se determinó en el número de cepas que portaban los genes *qnr*, no en el número de genes *qnr* que portaban las bacterias.

coexistencia de dos o tres genes, siendo *qnrS* y *qnrB* la combinación principal [18]. En una cepa de *K. pneumoniae* aislada en Túnez, se demostró la coexistencia de genes *qnrS* y *qnrB* [26]. Este es el primer reporte en Venezuela, de bacterias que albergan varios genes *qnr*. Es interesante ver cómo las enterobacterias aisladas de animales tienen mayor diversidad de estos genes (Tabla 3). El hecho de encontrar varios genes *qnr* en una sola cepa evidencia la importancia de la capacidad de difusión de estos plásmidos. Hay que verificar sobretodo en cepas ambientales, donde se puede evidenciar una distribución mayor de fluoroquinolonas, ejerciendo una presión selectiva importante.

En las muestras de Cumaná, se aislaron dos cepas de *C. farmeri*, una de aguas residuales y otra de la microbiota intestinal de un hombre. En ambas cepas se detectó el gen *qnrA*. No obstante, hay trabajos que avalan que el género *Citrobacter* es una fuente de los alelos *qnrB* [27]. De todos los genes *qnr*, el más distribuido a nivel mundial es *qnrB* y es el que mayor número de alelos descritos tiene [28]. Se sabe que el origen de los *qnrB* es *Citrobacter*, porque está presente en cepas almacenadas de la era preantibiótica [29]. Este es el primer trabajo en el mundo que reporta la presencia de *qnrA* en cepas de *C. farmeri*. Se necesitan estudios adicionales de secuenciamiento, para poder determinar el origen de este gen *qnr* en *C. farmeri*, el número de los alelos, así como estudios filogenéticos con otras cepas de los bancos de datos para sacar una hipótesis a propósito de su aparición y determinar si es una nueva variante con respecto a las ya reportadas. El gen más amplificado en muestras fecales humanas fue *qnrA*, pero también hubo personas portadoras de bacterias que albergan los genes *qnrC* y *qnrD* (Tabla 3). En India y Suecia se hallaron personas colonizadas con bacterias con determinantes de resistencia a fluoroquinolonas; en Suecia se encontró un porcentaje menor (8% *qnrB*, 11% *qnrS*, 11% *qnrD*), que en la India (26% *qnrD*, 83% *qnrB*, 85% *qnrS*). En ninguno de los dos países amplificaron los genes *qnrA* ni *qnrC* en portadores humanos [18]. En este estudio, se aisló el gen *qnrS* en una bacteria de origen animal y una de aguas residuales (Tabla 3). En la planta de tratamiento de agua de la ciudad de Tel Aviv, Israel, se encontró que el principal gen de resistencia a fluoroquinolonas en enterobacterias tanto de los sedimentos, como del agua, también fue *qnrS* [30], como lo aquí descrito. En muestras de efluentes de agua y de heces de pollos de la Comunidad Autónoma de Cataluña, España, se encontraron los genes *qnrA* y *qnrB* en heces de pollos y el gen *qnrS*, fue amplificado en las muestras de aguas servidas de hospitales y del río Ter de Cataluña [31]. Esto no es raro, ya que se sabe que el principal reservorio de genes *qnr* son especies bacterianas acuáticas [32]. Jilili y colaboradores demostraron la prevalencia de genes *qnr* presentes en aislamientos tunisianos en 2003 y 2007 al 2009, en pacientes que no habían recibido tratamiento con quinolonas. El gen *qnrB* fue detectado en 21 cepas de *K. pneumoniae*, 11 de *E. coli* y 6 *E. cloacae*. El gen *qnrS* solo fue amplificado en cepas de *K. pneumoniae*. Los genes *qnrA*, *qnrC* y *qnrD* no se amplificaron en ninguna de las 278

cepas de ese estudio [21]. La cepa *Pseudomonas aeruginosa* 8A6 que alberga el gen *qnrS* tuvo bajo nivel de resistencia a ciprofloxacina, sin embargo, presentó el gen *qnrA*. La cepa *E. coli* 8F8 que solo alberga el *qnrS* mostró alto nivel de resistencia a ciprofloxacina. En Italia se demostró que el determinante de resistencia *qnrS1* mantiene bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas en las bacterias que albergan el plásmido, pero que cuando las bacterias son expuestas a CMI bajas facilita la selección de alto nivel de resistencia [33]. Habría que determinar si la cepa *E. coli* 8F8 posee algún otro mecanismo de resistencia o solo estuvo expuesta a una presión selectiva ambiental. En pacientes graves con infecciones por bacterias resistentes, las fluoroquinolonas es una de las familias empleadas, para su tratamiento; sin embargo, en vista de los resultados encontrados en este trabajo, se recomienda realizar el despistaje de bacterias colonizantes en esos pacientes, que puedan albergar estos genes *qnr*, para no seleccionar cepas resistentes en los diferentes nichos ecológicos de sus microbiotas bacterianas comensales.

### Conclusión

La presencia de bacterias con genes *qnr* en la microbiota de humanos y animales, así como de aguas residuales, hace suponer que en Cumaná existe un abuso del uso de quinolonas en humanos y en animales de cría y de compañía. Lamentablemente, la CMI no es un reflejo del mecanismo de resistencia implicado, ya que cepas con valores sensibles albergan genes *qnr*, lo cual conlleva al fracaso terapéutico al proteger el blanco de la bacteria (topoisomerasas) del ataque del antibiótico. La mayor variabilidad de *qnr* se encontró en cepas de origen animal, lo cual sugiere una diseminación de elementos genéticos móviles de diferentes orígenes en esa población.

### Agradecimientos

Al Prof. Jesús Martínez-Yépez (Vicerrector Académico de la UDO), y a la Dra. Tahís Pico de Olivero (Vicerrectora Administrativa de la UDO), por su ayuda económica para poder asistir a Verona, para el procesamiento molecular de las muestras. Al Sr. Orlando Gómez (chofer del IIBCAUDO) por su disponibilidad en el traslado a los diferentes puntos de la ciudad para el muestreo realizado en este trabajo.

### Referencias

1. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70:369–413.
2. Hirai K, Aoyama H, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S. Differences in susceptibility fluoroquinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29:535–8.
3. Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. AcrAB efflux system: Expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella spp.* *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3984–6.
4. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6:629–40.
5. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998; 351:797–9.
6. Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Mammari H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:3523–5.
7. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martínez-Martínez L, Nordmann P, Pascual A, *et al.* *qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:2297–9.
8. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005; 41:S120–6.
9. Phillips PJ, Smith SG, Kolpin DW, Zaugg SD, Buxton HT, Furlong E. T, *et al.*, Pharmaceutical formulation facilities as sources of opioids and other pharmaceuticals to wastewater treatment plant effluents. *Environ Sci Technol.* 2010; 44:4910–6.
10. Holm JV, Ruedge K, Bjerg PL, Christensen TH. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ Sci Technol Lett.* 1995; 29:1415–20.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M02-A10 and M07-A8. Wayne PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
12. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordman P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60:394–7.
13. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:2872–4.
14. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, *et al.* New plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrC* found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agent Chemother.* 2009; 53:1892–7.
15. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD* a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovis Morbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:603–8.
16. Rivas P, Alonso G. Regulación de la dispensación de medicamentos y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela. *Rev Panam Salud Pub.* 2011; 30:592–7.
17. Aminov RI, Mackie RI. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 271:147–61.

18. Rutgersson C, Fick J, Marathe N, Kristiansson E, Janzon A, Angelin M, *et al.*, Fluoroquinolones and *qnr* genes in sediment, water, soil, and human fecal flora in an environment polluted by manufacturing discharges. *Environ Sci Technol.* 2014; 48:7825–32.
19. Thiele-Bruhn S, Beck IC. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere.* 2005; 59:457–65.
20. Andremont A, Walsh T. The role of sanitation in the development and spread of antimicrobial resistance. *AMR and the Contr.* 2015; 68–73.
21. Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:2464–9.
22. González F, Pallecchi L, Rossolini GM, Araque M. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrB19* in non-typhoidal *Salmonella enterica* strains isolated in Venezuela. *J Infect Dev Ctries.* 2012; 6:462–4.
23. González F, Araque M. Association of transferable quinolone resistance determinant *qnrB19* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Salmonella* GIVE and *Salmonella* Heidelberg in Venezuela. *Int J Microbiol.* 2013; Article ID 628185. doi: 10.1155/2013/628185.
24. Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *J Environm Manage.* 2009; 90:2354–66.
25. Huang S, Dai W., Sun S, Zhang X, Zhang L. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants among carbapenem non-susceptible *Enterobacter cloacae*. *PLoS ONE.* 2012; 7: e47636. doi: 10.1371/journal.pone.0047636.
26. Jlili N, Réjiba S, Smaoui H, Guillard T, Chau F, Kechrid A, Cambau E. Trend of plasmid-mediated quinolone resistance genes at the Children’s Hospital in Tunisia. *J Med Microbiol.* 2014; 63:195–202.
27. Jacoby G, Griffin C, Hooper D. *Citrobacter* spp. as source of *qnrB* alleles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:4979–84.
28. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22:664–89.
29. Saga T, Sabtcheva S, Ishii Y, Kaku M, Yamaguchi K. Characterization of *qnrB*-like gene in *Citrobacter* species of American Type Culture Collection (ATCC) strains. 49th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2009. Abstr. C2-713.
30. Kaplan E, Ofek M, Jurkevitch E, Cytryn E. Characterization of fluoroquinolone resistance and *qnr* diversity in Enterobacteriaceae from municipal biosolids. *Front Microbiol.* 2013; 4:144. doi: 10.3389/fmicb.2013.00144.
31. Marti E, Balcázar J. Real-Time PCR assays for quantification of *qnr* genes in environmental water samples and chicken feces. *App Environ Microbiol.* 2013; 79:1743–5.
32. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front Microbiol.* 2012; 3:24. doi: 10.3389/fmicb.2012.00024.
33. Kocsis B, Kocsis E, Fontana R, Cornaglia G, Mazzariol A. Identification of *bla*<sub>LAP-2</sub> and *qnrS1* genes in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST147 clone. *J Med Microbiol.* 2013; 62:269–73.