

ARTÍCULO ORIGINAL

Resistencia a antibióticos generada mediante mutaciones cromosómicas en aislados de *Escherichia coli* provenientes de coprocultivos de niños de una comunidad de Lima, Perú

Brenda Ayzanoa¹, Diego Cuicapuza^{1,2}, Pablo Tsukayama^{1,2,3,4}

¹ Laboratorio de Genómica Microbiana, Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

² Emerge (Emerging Diseases and Climate Change Research Unit), Facultad de Salud Pública y Administración, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

⁴ Parasites and Microbes Program, Wellcome Sanger Institute, Hinxton, United Kingdom

RESUMEN

Escherichia coli es una enterobacteria que forma parte del microbioma intestinal de los mamíferos y es capaz de causar diversas enfermedades, especialmente en poblaciones vulnerables. Adicionalmente, la emergencia de variantes de *E. coli* resistentes a los antibióticos supone una creciente amenaza global para la salud pública. Esta resistencia, usualmente es codificada por múltiples genes, que codifican para la expresión de enzimas, proteínas de membrana, porinas, bombas de flujo o mutaciones de la molécula diana. Investigaciones recientes han reportado mutaciones específicas asociadas a resistencia, como *qnr*, *pmrB*, *glpT*, y la variante *bla*_{TEM} (C32T). El objetivo de este estudio fue identificar la frecuencia de mutaciones cromosómicas que otorgan resistencia antibiótica en genomas de *E. coli* provenientes de niños en el distrito de Villa El Salvador en Lima, Perú. Un total de 19 genomas completos de *E. coli* fueron descargados a partir del Bioproyecto PRJNA633873 ubicado en GenBank de NCBI. Después de convertir y evaluar la calidad de las lecturas con FastQC, se realizó un ensamblaje mediante SPAdes v3.15.2 y evaluación de contigs a través de QUAST v5.0.2. Se identificaron perfiles genómicos de tipo de secuencia multilocus (MLST) con PubMLST y buscamos genes de resistencia con AMRFinderPlus. Finalmente, analizamos los patrones de genes y la ausencia/presencia de estos mediante MCA, usando Stata v17 y R studio. Un total de 11 genomas presentaron un total de siete mutaciones en genes asociados a resistencia a cuatro familias de antibióticos, incluyendo *glpT* (E448) para fosfomicina, *pmrB* (Y358) para colistina, *gyrA* (S83L) y *parC*_S57T para quinolonas, *bla*_{TEM} (C32T) para amoxicilina con ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam, y *cyaA* (S352T) para fosmidomicina. Se evaluaron las relaciones proximales para la presencia/ausencia de genes que incluyó los genes *bla*_{TEM}, *catA1*, *sull1*, *qnrB19*, *tetA* y *mphA*. Nuestro estudio describe por primera vez las mutaciones en genes asociados a la resistencia antimicrobiana en genomas de *E. coli* provenientes de población pediátrica de una comunidad en Lima, Perú.

Palabras clave: Resistencia a Antibióticos; Estructuras Cromosómicas; *Escherichia coli*; Niño (Fuente: DeCS)


Citar como:


Ayzanoa B, Cuicapuza D, Tsukayama P. Resistencia a antibióticos generada mediante mutaciones cromosómicas en aislados de *Escherichia coli* provenientes de coprocultivos de niños de una comunidad de Lima, Perú. *Investig Innov Clin Quir Pediatr*. 2024;2(1):14-9. doi:10.59594/iicqp.2024.v2n1.77


Autor correspondiente:

Pablo Tsukayama
Correo electrónico:
pablo.tsukayama@upch.pe

ORCID iDs

Brenda Ayzanoa
 <https://orcid.org/0000-0001-9059-9544>

Diego Cuicapuza
 <https://orcid.org/0000-0002-5735-4614>

Pablo Tsukayama
 <https://orcid.org/0000-0002-1669-2553>

Recibido : 02/04/2024

Aprobado : 02/04/2024

Publicado : 23/04/2024



Esta es una publicación con licencia de Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

Copyright © 2024, Investigación e Innovación Clínica y Quirúrgica Pediátrica.

Chromosomal mutations in commensal *Escherichia coli* genomes: drivers of antibiotic resistance among children in a community in Lima, Peru

ABSTRACT

Escherichia coli is an enterobacterium that is part of the intestinal microbiome of mammals and is capable of causing various diseases, especially in vulnerable populations. Additionally, the emergence of antibiotic-resistant variants of *E. coli* poses a growing global threat to public health. This resistance is usually encoded by multiple genes, which code for the expression of enzymes, membrane proteins, porins, efflux pumps, or target molecule mutations. Recent research has reported specific resistance-associated mutations, such as *qnr*, *pmrB*, *glpT*, and the *bla* variant (C32T). The aim of this study was

to identify the frequency of chromosomal mutations that confer antibiotic resistance in *E. coli* genomes from children in the district of Villa El Salvador in Lima, Peru. A total of 19 complete *E. coli* genomes were downloaded from Bioproject PRJNA633873 located at NCBI GenBank. After converting and assessing the quality of the reads with FastQC, assembly was performed using SPAdes v3.15.2 and contig evaluation through QUAST v5.0.2. Multilocus sequence type (MLST) genomic profiles were identified with PubMLST, and we searched for resistance genes using AMRFinderPlus. Finally, we analyzed gene patterns and gene absence/presence by MCA using Stata v17 and R studio. A total of 11 genomes had a total of seven mutations in genes associated with resistance to four antibiotic families, including *glpT*(E448) for fosfomicin, *pmrB* (Y358) for colistin, *gyrA*(S83L) and *parC*_S57T for quinolones, *bla*_{TEM} (C32T) for amoxicillin with clavulanic acid and piperacillin-tazobactam, and *cyaA*(S352T) for fosmidomycin. Proximal relationships were evaluated for the presence/absence of genes that included *bla*_{TEM}, *catA1*, *sul1*, *qnrB19*, *tetA*, and *mphA* genes. Our study is the first to describe gene mutations associated with antimicrobial resistance in *E. coli* genomes from a pediatric population in a community in Lima, Peru.

Keywords: Antibiotic Resistance; Chromosome Structures; *Escherichia coli*; Child (Source: MeSH)

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana representa una creciente amenaza para la salud pública global en los últimos años. La Organización Mundial de la Salud ha reportado a las enterobacterias como *Escherichia coli* como un grupo prioritario de alto riesgo para la salud pública (1), debido a los numerosos reportes de genes que le confieren resistencia a antibióticos (2). *E. coli* es una bacteria comensal que habita en el intestino de prácticamente todos los seres vivos. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas y desempeñan un papel fundamental en la digestión, algunas variantes pueden causar enfermedades intra y extraintestinales, como infecciones en el tracto urinario (UTI por sus siglas en inglés), bacteriemia, diarrea, neumonía, entre otros (3,4). Es muy frecuente que la población infantil se vea afectada por algunas de las condiciones mencionadas, sobre todo diarrea, meningitis y neumonía (5).

Se han reportado estudios indicando que *E. coli* presenta diversas mutaciones en genes y regiones específicas las cuales desempeñan un papel crucial en la resistencia a diferentes antibióticos (6,7). Entre estos, las mutaciones *qnr*, *pmrB* y *glpT* se han identificado como determinantes significativas de resistencia (8-10). La mutación puntual del gen *gyrA*, que codifica la topoisomerasa II, ha sido asociado con resistencia a quinolonas (11), mientras que *pmrB*, un regulador de la resistencia a polimixinas, ha demostrado influir en la capacidad de *E. coli* para resistir a este tipo de antibióticos. Este último recibe mucha más atención debido a que el grupo de las polimixinas, conocido como “droga de último recurso”, es utilizado como última instancia para tratamientos clínicos (12). Por otro lado, *glpT*, transportador de glicerol-3-fosfato, ha sido implicado en la resistencia a fosfomicina (13). Además, la variante *bla*_{TEM} C32T del gen *bla*_{TEM}, responsable

de la producción de beta-lactamasas, se ha vinculado con la resistencia a betalactámicos debido a una variante en el promotor 3 (14).

Considerando que los estudios genómicos de *E. coli* en la población infantil peruana han sido escasos durante los últimos años, el objetivo del estudio fue identificar la presencia de mutaciones que otorgan resistencia antibiótica en genomas de *E. coli* provenientes de niños de una comunidad de Lima, Perú. La importancia de este enfoque radica en la necesidad de comprender la frecuencia y diversidad de las mutaciones que contribuyen a la resistencia antibiótica en proveniente de una población específica poco estudiada, de manera que esta información pueda ser luego utilizada para la toma de decisiones en el manejo de los pacientes.

MÉTODOS

Se obtuvieron 19 archivos de lectura de secuencias (SRA) que contenían datos de *E. coli* a partir de muestras fecales recogidas de niños clínicamente sanos menores de 24 meses en una comunidad de Lima. Se accedió a estos archivos utilizando el módulo SRA-Tools para su posterior análisis. El estudio, publicado por Murray *et al.* (15), tuvo por objetivo monitorear los niveles de resistencia fenotípicos y genes de resistencia presentes en el genoma de *E. coli* de diferentes fuentes humanas y animales. Para este estudio, se utilizaron los archivos SRA depositados en el Bioproyecto PRJNA633873 del GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para el análisis, se convirtieron a formato FASTQ mediante *fasterq-dump* y se evaluó la calidad de las lecturas utilizando *FastQC* v0.11.5. Luego, se recortaron los adaptadores y se eliminaron las secuencias de baja calidad utilizando *Trimmomatic* v0.39. El ensamblaje *de novo* se realizó con SPAdes v3.15.2 utilizando los parámetros por defecto. Finalmente, se evaluó la calidad de los contigs utilizando QUAST v5.0.2. Se identificaron los perfiles genómicos de tipo de secuencia multilocus (MLST) utilizando PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/escherichia-spp>) y se buscaron los genes de resistencia a los antimicrobianos (ARG) y mutaciones utilizando AMRFinderPlus con una longitud de cobertura ≥ 90 %, identidad nucleotídica ≥ 90 %. Se analizaron los patrones genotípicos de los genes *bla*_{TEM}, *catA1*, *sul1*, *qnrB19*, *tetA* y *mphA* utilizando el análisis de correspondencias múltiples (MCA) para explicar las relaciones de presencia/ausencia de genes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) entre los aislados, mediante la derivación de dos dimensiones. El análisis de MCA se llevó a cabo utilizando el programa Stata v17 (StataCorp, College Station, TX, EE. UU.) y R studio.

RESULTADOS

De las 19 secuencias de *E. coli* obtenidas en niños sanos de una comunidad, 11 presentaron un total de 7 mutaciones cromosómicas en genes asociados a la resistencia a cuatro familias de antibióticos. Los 11 genomas tuvieron la mutación

glpT (E448), la cual está asociada a la resistencia a fosfomicina, mientras que seis de ellos presentaron también la mutación *pmrB* (Y358), asociada a la resistencia a colistina. Dos aislados tuvieron las tres mutaciones *glpT* (E448), *pmrB* (Y358) y *gyrA* (S83L), esta última relacionada con la resistencia a quinolonas. Se observaron otros patrones de resistencia por mutaciones, destacando el patrón de mutaciones *glpT* (E448),

bla_{TEM} (C32T), que confiere resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam, y *cyaA* (S352T), que brinda resistencia a fosmidomicina. También se identificó el patrón de mutaciones *glpT* (E448), *bla_{TEM}* (C32T), *cyaA* (S352T), *parC*_S57T, que confiere resistencia a fosfomicina, y *uhpT*_E350Q, responsable de la resistencia a quinolonas (Figura 1).

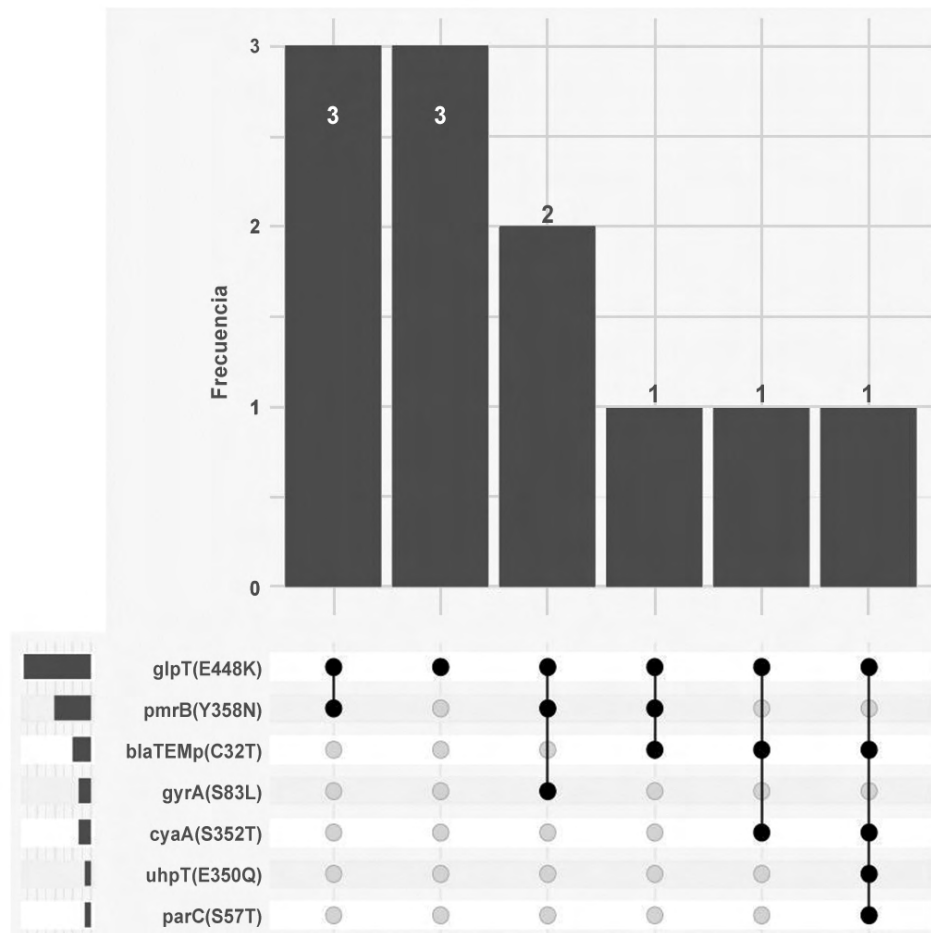


Figura 1. Flujograma de la selección de publicaciones para el análisis final.

El MCA realizado para evaluar las relaciones proximales para la presencia/ausencia de genes, incluyó los genes *bla_{TEMp}*, *catA1*, *sul1*, *qnrB19*, *tetA* y *mphA*, por ser los genes más representativos en nuestro estudio. El modelo bidimensional explicó el 84.2 % de la varianza total de las variables originales (primera dimensión = 58.6 %; segunda dimensión = 24.6 %).

La Figura 2 resalta la agrupación de genomas en base a la ausencia de los genes de resistencia, coincidiendo en su mayoría. Los genes más relacionados fueron *catA1*, *sul1* y *mphA* ya que estos estaban ausentes en un promedio de 80.7 %. El porcentaje de coincidencia de ausencia de genes para *bla_{TEMp}* y *tetA* fue del 57.9 % y 73.7 %, respectivamente.

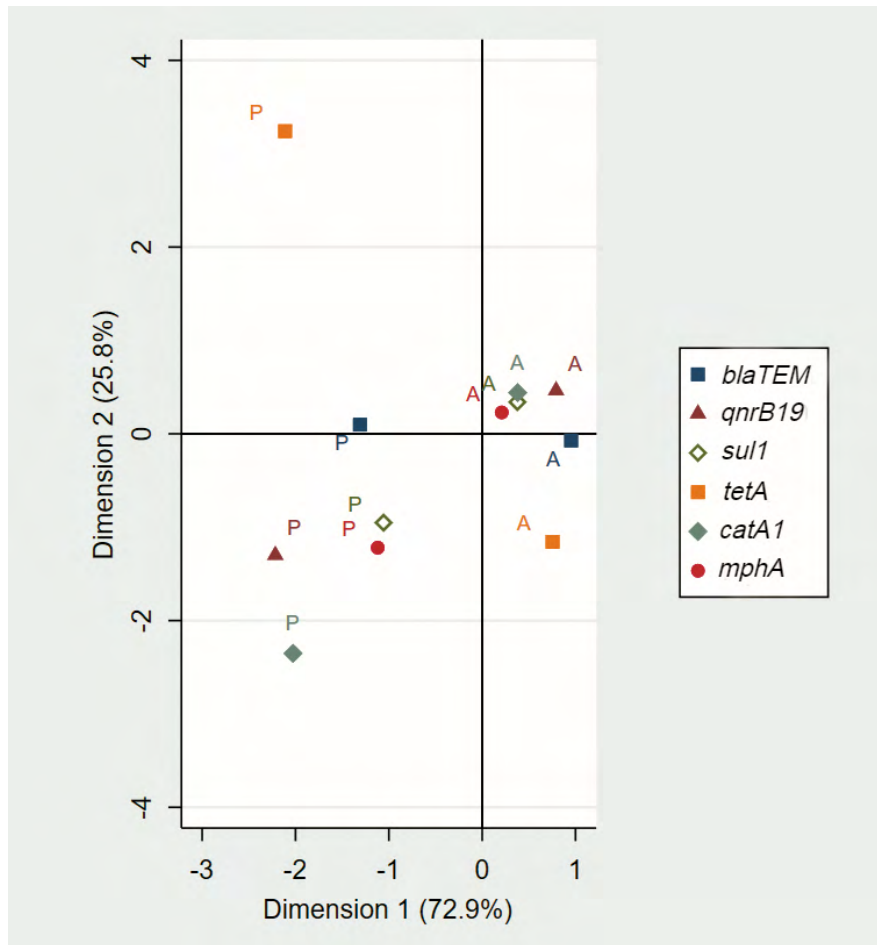


Figura 2. Gráfico de coordenadas MCA para la caracterización genotípica de *E. coli*. A, ausencia; P, presencia.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio describe por primera vez las mutaciones en genes asociados a la resistencia antimicrobiana en genomas de *E. coli* provenientes de población pediátrica de una comunidad en Lima, Perú. *E. coli* es una bacteria causante de numerosas infecciones durante la edad pediátrica, como gastroenteritis, neumonía intrahospitalaria, infecciones del tracto urinario, osteomielitis neonatal, meningitis, sepsis, entre muchas otras (16). Debido a la presión selectiva ejercida por el uso de antimicrobianos, se han reportado múltiples patrones de resistencia en estas bacterias, incluyendo a las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las betalactamasas AmpC, carbapenemasas, así como la resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y polimixinas (17). La distribución de *E. coli* resistente es diversa en todo el mundo, y varían también según la población estudiada (18-24). Los estudios en población pediátrica aún son limitados, y más aún cuando involucran individuos clínicamente sanos como en nuestro estudio.

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un problema de salud pública mundial en los últimos años

y es un impedimento importante para el tratamiento de las enfermedades infantiles en países en desarrollo como Perú (25). Las bacterias comensales pueden desempeñar un papel crucial en la propagación de la resistencia dentro de una comunidad, al actuar como un reservorio importante de genes de resistencia (26,27). La exposición de comensales como *E. coli* a los antibióticos aumenta los niveles de transporte de organismos resistentes y, si está mediada por plásmidos, la resistencia podría transmitirse a un organismo adquirido más virulento (28). La poca regulación en el uso de antibióticos es uno de los factores principales en la emergencia de bacterias resistentes en poblaciones humanas (29,30). Esta situación se ve recrudescida particularmente en países en desarrollo como el Perú, debido al hacinamiento, pobre manejo de excretas y agua disponible, falta de regulaciones y políticas, así como la falta de conocimientos sobre resistencia antimicrobiana (31).

En el Perú, se ha reportado los niveles de resistencia a diferentes antibióticos de *E. coli* comensales en niños, obteniéndose altos niveles de resistencia a diferentes antibióticos como ampicilina, sulfatrimetoprim, tetraciclina, estreptomina

y cloranfenicol, con hasta un 90 % (n=1,080) de aislados multidrogo-resistentes (MDR). Adicionalmente, los genes de resistencia más frecuentemente encontrados fueron *bla*_{TEM} *tetA*, *dfrA8*, *sul1*, *sul2* y *cat1* (31). En otro estudio publicado en Perú (15), se determinaron los perfiles de resistencia de 60 aislados de *E. coli* provenientes de población pediátrica entre 0 a 2 años. Los aislados también presentaron altos niveles de resistencia, principalmente para tetraciclinas, sulfatrimetoprim, amoxicilina, azitromicina, cloranfenicol, cefalotina, cefotaxima y gentamicina, con un 48 % de aislados MDR (32). Los resultados de resistencia encontrados fueron alarmantes, reportando inclusive un aislado portador del gen *mcr-1* para resistencia a colistina (32).

La vigilancia genómica de resistencia usualmente está enfocada en la detección de genes adquiridos por transferencia horizontal de genes (33). En este estudio exploramos por primera vez la presencia de mutaciones puntuales para la detección de mecanismos de resistencia en *E. coli* comensales provenientes de una población pediátrica en el Perú. La alta frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia encontradas, resalta la necesidad de implementar una vigilancia genómica de resistencia antimicrobiana no solo en pacientes, sino también en bacterias comensales.

Contribución de los autores

Conceptualización: BA; colección, manejo y curación de datos: BA, DC; análisis de datos: BA, DC; visualización: DC redacción de la versión original: BA, DC, PT; interpretación de resultados: BA, DC; redacción y revisión de la versión final: BA, DC, PT.

Financiamiento

El presente estudio fue autofinanciado.

Aspectos éticos

No aplica.

Conflictos de interés

Los autores no tienen ningún conflicto de interés asociado con el material presentado en el manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Geneva: WHO; 2017 [citado el 1 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2018;6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017
- García A, Fox JG. A One Health Perspective for Defining and Deciphering *Escherichia coli* Pathogenic Potential in Multiple Hosts. *Comp Med*. 2021;71(1):3-45. doi: 10.30802/AALAS-CM-20-000054
- Mueller M, Tainter CR. *Escherichia coli* Infection. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 1 de marzo de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Khan A, Bhutta Z. Childhood Infectious Diseases: Overview. In: International Encyclopedia of Public Health. 2017. p. 517-38.
- Bhutta ZA, Saeed MA. Childhood Infectious Diseases: Overview. In: International Encyclopedia of Public Health. Elsevier; 2008. p. 620-40.
- Mori H, Kataoka M, Yang X. Past, Present, and Future of Genome Modification in *Escherichia coli*. *Microorganisms*. 2022;10(9):1835. doi: 10.3390/microorganisms10091835
- Leekitcharoenphon P, Johansson MHK, Munk P, Malorny B, Skarżyńska M, Wadepohl K, et al. Genomic evolution of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2021;11(1):15108. doi: 10.1038/s41598-021-93970-7
- Garallah ET, Al-Jubori SS. Molecular detection of *glpT* and *uhpT* genes as fosfomycin pathways in UTI infection patients. *Gene Rep*. 2020;21:100930. doi: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100930>
- Phan MD, Nhu NTK, Achard MES, Forde BM, Hong KW, Chong TM, et al. Modifications in the *pmrB* gene are the primary mechanism for the development of chromosomally encoded resistance to polymyxins in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(10):2729-36. doi: 10.1093/jac/dkx204
- Vinué L, Hooper DC, Jacoby GA. Chromosomal mutations that accompany *qnr* in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(3):479-83. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.01.012
- Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1354(1):12-31. doi: 10.1111/nyas.12830
- Sharma J, Sharma D, Singh A, Sunita K. Colistin Resistance and Management of Drug Resistant Infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2022;2022:4315030. doi: 10.1155/2022/4315030
- Silver LL. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(2):a025262. doi: 10.1101/cshperspect.a025262
- Murray M, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, et al. Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Front Microbiol*. 2021;12:635871. doi: 10.3389/fmicb.2021.635871
- Chen ST, Clowes RC. Nucleotide sequence comparisons of plasmids pHD131, pJB1, pFA3, and pFA7 and beta-lactamase expression in *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*. 1987;169(7):3124-30. doi: 10.1128/jb.169.7.3124-3130.1987
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):123-40. doi: 10.1038/nrmicro818
- Paitan Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018;416:181-211. doi: 10.1007/82_2018_110
- Berglund B, Chen B, Tärnberg M, Sun Q, Xu L, Welander J, et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and toxin genes from human fecal samples from China. *Future Microbiol*. 2018;13:1647-55. doi: 10.2217/fmb-2018-0242
- Chen B, Berglund B, Wang S, Börjesson S, Bi Z, Nilsson M, et al. Rapid increase in occurrence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in healthy rural residents in Shandong Province, China, from 2015 to 2017. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022;28:38-42. doi: 10.1016/j.jgar.2021.11.007
- Ling TK, Liu EY, Cheng AF. A 13-year study of antimicrobial susceptibility of common gram-negative bacteria isolated from the bloodstream in a teaching hospital. *Chemotherapy*. 2001;47(1):29-38. doi: 10.1159/000048498
- Losada I, Barbeito G, García-Garrote F, Fernández-Pérez B, Malvar A, Hervada X, et al. Estudio de sensibilidad de *Escherichia coli* productores de infecciones del tracto urinario comunitarias en Galicia. Período: 2016-2017. *Aten Primaria*. 2020;52(7):462-8. doi: 10.1016/j.aprim.2019.06.007

23. Kurowski KM, Marusinec R, Amato HK, Saraiva-Garcia C, Loayza F, Salinas L, et al. Social and Environmental Determinants of Community-Acquired Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* in Children Living in Semirural Communities of Quito, Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* 2021;105(3):600-10. doi: 10.4269/ajtmh.20-0532
24. Martos I, Colucci Camusso G, Albornoz M, Barros Nores J, Juaneda R, Belisle DF, et al. Perfil etiológico y sensibilidad antimicrobiana en 1740 infecciones urinarias de la comunidad en la ciudad de Córdoba, Argentina. *Arch Esp Urol.* 2021;74(7):645-51.
25. Malchione MD, Torres LM, Hartley DM, Koch M, Goodman JL. Carbapenem and colistin resistance in Enterobacteriaceae in Southeast Asia: Review and mapping of emerging and overlapping challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;54(4):381-99. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.07.019
26. Kalter HD, Gilman RH, Moulton LH, Cullotta AR, Cabrera L, Velapatiño B. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* carriage in young children in Peru: community-based cross-sectional prevalence study. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(5):879-88. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0143
27. Austin DJ, Kakehashi M, Anderson RM. The transmission dynamics of antibiotic-resistant bacteria: the relationship between resistance in commensal organisms and antibiotic consumption. *Proc Biol Sci.* 1997;264(1388):1629-38. doi: 10.1098/rspb.1997.0227
28. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):232-60 ; second page, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
29. Tenover FC, McGowan JE Jr. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *Am J Med Sci.* 1996;311(1):9-16. doi: 10.1097/00000441-199601000-00003
30. Austin DJ, Kristinsson KG, Anderson RM. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(3):1152-6. doi: 10.1073/pnas.96.3.1152
31. Gold HS, Moellering RC Jr. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med.* 1996;335(19):1445-53. doi: 10.1056/NEJM19961107335190
32. Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Dell'Amico E, Roselli M, Strohmeyer M, et al. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. *J Infect Dis.* 2004;189(7):1291-4. doi: 10.1086/382191
33. Bartoloni A, Pallecchi L, Benedetti M, Fernandez C, Vallejos Y, Guzman E, et al. Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(6):907-13. doi: 10.3201/eid1206.051258