

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Resistencia a antibióticos asociada a plásmidos en cepas
de *Escherichia coli* aisladas de aves de traspatio de
cuatro municipios del Estado de México**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MONICA BOBADILLA MORALES

CODIRECTORES

DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN

CUERNAVACA, MORELOS, ABRIL 2022

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Deyanira Pérez Morales y del Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo estuvo financiado por el donativo CONACYT-Problemas Nacionales, número 2017-01-5182.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer a mis directores de tesis a la Dra. Deyanira Pérez Morales y al Dr. Víctor Bustamante por aceptarme en su laboratorio, por su ayuda, paciencia y dedicación que me permitió un buen aprovechamiento en el trabajo realizado y que esta tesis llegara a un buen término.

Especialmente a mi mamá Hortencia Morales Velázquez y mi papá Margarito Bobadilla Toledo, por ser los primordiales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mí. Por todo el esfuerzo que realizaron para poder darme estudio y que hoy en día sea la persona que soy. Por nunca dejarme sola y apoyarme en todas mis decisiones, por todos los consejos para no dejarme caer. Gracias a dios por sus vidas y que me estén viendo cumplir un sueño más en mi vida.

A mi pequeña hija Antonella y mi esposo Axel Catalán por ser el motor más grande de mi vida para dar todo de mí y ser una mejor persona en esta vida.

Gracias a todos mis compañeros del grupo del Dr. Víctor Bustamante por los consejos en cada seminario y explicaciones en cada experimento a realizar.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio 2 por el buen recibimiento y por ayudarme en cada momento que necesitara ayuda, por consejos y por su tiempo. A cada uno de mis sinodales al M. en B. Luis Enrique Cruz Trujillo, Dra. Verónica Obregón Barboza y el Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, por cada una de sus correcciones, especialmente al Dr. Martin Talavera Rojas por haber proveído el material para que este trabajo se pudiera llevar a cabo.

INDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades de los antibióticos	3
1.2 Resistencia a antibióticos	4
1.2.1 Resistencia intrínseca	5
1.2.2 Resistencia adquirida	5
1.2.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos	6
1.2.4 Transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias	7
1.3 Crisis actual por la resistencia a antibióticos	9
1.4 Selección de bacterias resistentes a antibióticos	10
1.4.1 Uso de antibióticos en la salud humana	11
1.4.2 Uso de antibióticos en animales del sector pecuario	12
1.5 Diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y de genes que confieren resistencia a antibióticos en la naturaleza	14
1.6 Importancia de la implementación de programas de vigilancia de bacterias resistentes a antibióticos en ambientes no clínicos	16
1.7 Características generales de <i>Escherichia coli</i>	17
1.7.1 Genes de resistencia a antibióticos localizados en plásmidos en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de animales	19
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
6. METODOLOGÍA.....	26
6.1 Cepas de <i>E. coli</i> analizadas	26
6.2 Preparación de medios de cultivo	27
6.3 Determinación cuantitativa de susceptibilidad/resistencia a antibióticos	27
6.4 Extracción de plásmidos	31
6.5 Preparación de células competentes para electroporación	32
6.6 Electroporación	33
7. RESULTADOS	34
7.1 Algunas cepas de <i>E. coli</i> aisladas de aves de traspatio presentan multirresistencia a antibióticos	34
7.2 La prevalencia de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de aves de traspatio resistentes a antibióticos está asociada con el municipio de colecta	38
7.3 Las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de aves de traspatio son portadoras de plásmidos que le confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina	39
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS.....	53
11. BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

En México, aproximadamente el 75% de los hogares rurales utilizan a la avicultura de traspatio como sistema de producción. Este hecho incrementa significativamente el contacto entre personas y aves de corral vivas, lo que implica un mayor riesgo para la salud pública en la transmisión de bacterias zoonóticas y de origen alimenticio resistente a antibióticos.

En este trabajo se determinó el perfil de susceptibilidad a antibióticos en 40 aislados de cepas comensales de *Escherichia coli* provenientes de la cloaca de aves criadas en traspatios de zonas rurales y peri-urbanas de cuatro municipios del Estado de México, detectando aislamientos resistentes y multirresistentes. El panel de fármacos probados incluyó antibióticos de importancia crítica para la salud humana (ampicilina, ciprofloxacina, cefoperazona, colistina y tetraciclina) que pertenecen a cinco familias distintas de antibióticos. El 57.5% de las cepas presentaron un fenotipo resistente, mientras que el 22.5% mostraron multirresistencia.

El mayor porcentaje de resistencia se detectó frente a la tetraciclina y ampicilina (87.5 y 72%, respectivamente). De los siete diferentes patrones de resistencia encontrados, el más frecuente fue el patrón de resistencia Tc/Amp (37.5%). En el municipio de Ixtlahuaca fue donde se detectó el mayor porcentaje de cepas multirresistentes (71.4%), mientras que El Oro tuvo la mayor prevalencia de fenotipos resistentes (87.5%) y en Jocotitlán hubo una mayor frecuencia de cepas susceptibles (42.9%). De manera relevante, se determinó que algunas de las cepas de *E. coli* farmacorresistentes aisladas de aves de traspatio portan plásmidos de <38-154 Kb y que estos contribuyen al fenotipo de la resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina.

Un mejor conocimiento de la ecología y la epidemiología de *E. coli* comensales resistentes a antibióticos en el entorno de las aves de corral de traspatio es necesario, con el fin de identificar los riesgos potenciales de transmisión a las personas que están en contacto cercano.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los antibióticos

Los antibióticos son compuestos con la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de bacterias susceptibles mediante su interacción con blancos moleculares específicos que se encuentran en la célula bacteriana (Andersson and Hughes, 2017). Los antibióticos pueden ser de origen natural (producidos por bacterias, hongos o plantas); semi-sintético (derivados de antibióticos naturales que son modificados químicamente); o sintético (sintetizados químicamente).

La era moderna de los antibióticos inició en 1928 con el descubrimiento de la penicilina por el bacteriólogo británico Alexander Fleming en el Hospital St. Mary de Londres (Acuña, 2002). Tras varios días de ausencia en el laboratorio donde trabajaba, a su regreso Fleming notó que una de las placas Petri en donde había cultivado a la bacteria *Staphylococcus aureus* se había contaminado con el hongo *Penicillium notatum* (Fleming, 1945). Curiosamente, el crecimiento de la bacteria parecía haberse inhibido exactamente en el sitio en el que entraba en contacto con el hongo contaminante, por lo que de manera muy perspicaz, Fleming formuló la hipótesis de que dicho hongo había secretado una sustancia que inhibió el crecimiento de *S. aureus* (Acuña, 2002). Más tarde comprobó su hipótesis de manera sistemática, y a la sustancia secretada por el hongo *P. notatum* que tenía la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano (actividad antibacteriana) la denominó penicilina, por *Penicillium* (Fleming, 1945). Pocos años después, la penicilina se convirtió en el primer antibiótico en ser prescrito en la clínica y se administró en seres humanos para tratar diversas infecciones bacterianas (ACS and RCS, 1999).

Durante las décadas siguientes se descubrieron muchos otros antibióticos, principalmente entre 1950 y 1960, los cuales fueron clasificados en distintas familias con base en su estructura química (**Figura 1**). Estos antibióticos se produjeron en masa y se administraron clínicamente, lo cual constituyó un suceso trascendental en la medicina humana, ya que se pudieron curar diversas infecciones bacterianas que en aquel

entonces producían altas tasas de mortalidad (Beloso, 2009; Ventola, 2015). Pocos años después de que los antibióticos fueron administrados para curar infecciones en seres humanos, estos empezaron a ser utilizados también en la veterinaria (Witte, 2000). Sin embargo, otro suceso significativo ligado a la administración de los antibióticos es que el uso generalizado de cualquier nuevo antibiótico ha llevado invariablemente a la identificación de cepas patógenas resistentes a ese antibiótico en hospitales, desde la penicilina hasta la última clase de antibióticos descubierta (Barber and Rozwadowska-Dowzenko, 1948; Marston *et al.*, 2016) (**Figura 1**). Diversos trabajos han evidenciado la correlación entre el surgimiento de cepas resistentes a antibióticos y el consumo de antibióticos en humanos (Goossens *et al.*, 2005) y animales (Mathew *et al.*, 2007; McEwen and Fedorka-Cray, 2002; Witte, 2000).

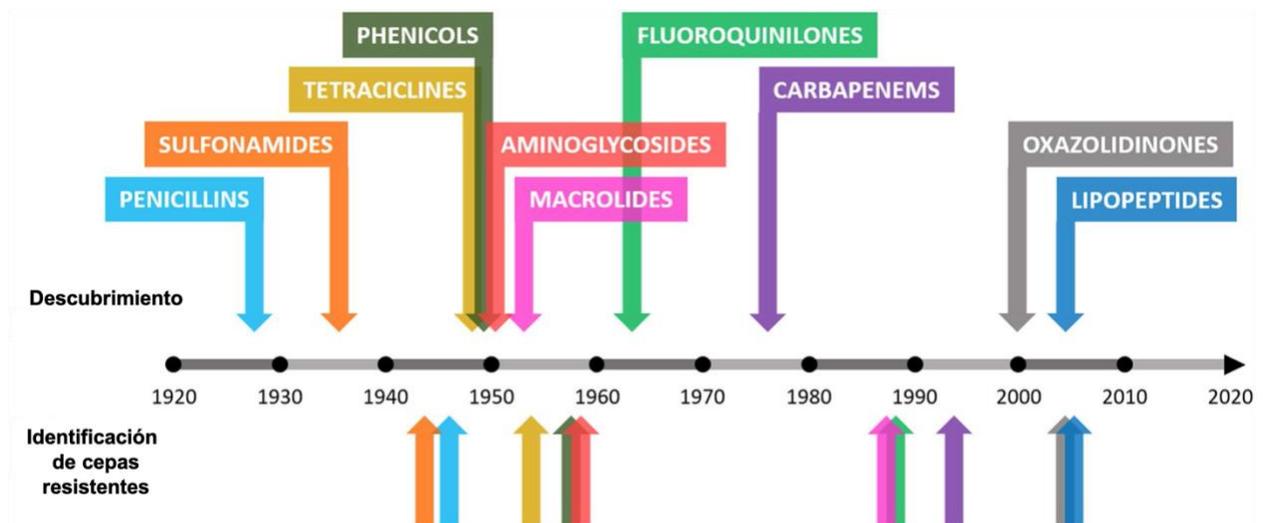


Figura 1. Línea de tiempo del descubrimiento de las principales familias de antibióticos y la detección de resistencia en aislados bacterianos. Cada familia de antibióticos está representada por una flecha de un color determinado. Para cada familia de antibióticos se indica el año aproximado en el que se descubrió (parte superior) y el año en el que se identificaron cepas clínicas resistentes a algún miembro de esa familia de antibióticos (parte inferior). Tomado de Álvarez-Martínez *et al.* (2021).

1.2 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos es la capacidad que tienen algunas bacterias para proliferar en concentraciones letales de antibióticos, dando como resultado que dichos compuestos se vuelvan ineficaces para contrarrestar a estas bacterias (Spengler *et al.*, 2017).

Las bacterias resistentes a antibióticos se pueden clasificar en multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) o pan-resistentes (PDR) (Magiorakos *et al.*, 2012). MDR se refiere a una cepa bacteriana resistente a al menos un antibiótico que pertenezca a tres o más familias distintas de antibióticos. XDR es una cepa resistente a al menos un antibiótico que pertenezca a todas excepto dos o menos categorías de antibióticos, es decir, que son susceptibles a sólo una o dos categorías diferentes de antibióticos. PDR es una cepa resistente a todos los antibióticos de todas las categorías.

La resistencia de las bacterias frente a los antibióticos puede ser intrínseca (natural) o adquirida.

1.2.1 Resistencia intrínseca

Se presenta cuando de manera natural, las bacterias poseen características innatas de tipo funcional o estructural que evitan la acción de ciertos antibióticos. Ejemplos de resistencia intrínseca son la ausencia del blanco de acción del antibiótico y la escasa permeabilidad a la entrada del antibiótico debido a la composición específica de su membrana citoplasmática (Blair *et al.*, 2015). Estas propiedades innatas se expresan permanentemente, son independientes de la presión de selección que ejercen los antibióticos y no se atribuyen a eventos de transferencia horizontal de genes (Cox and Wright, 2013).

1.2.2 Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es una propiedad específica que surge en ciertas cepas de una especie bacteriana que naturalmente es susceptible al efecto de un antibiótico, pero que al ser modificada genéticamente, ya sea por mutaciones en genes cromosomales o por la adquisición de nuevos elementos genéticos asociados con la resistencia a antibióticos, se torna invulnerable a la acción del antibiótico (Pérez-Cano and Robles-Contreras, 2013). En bacterias, la información genética que confiere resistencia a antibióticos puede localizarse tanto en regiones cromosomales como en elementos extra-cromosomales como los plásmidos (Partridge *et al.*, 2018).

Debido a que las bacterias se adaptan para subsistir a las condiciones del medio ambiente a través de la selección natural, la resistencia adquirida es un proceso evolutivo que está directamente correlacionado con la presión de selección que ejercen los antibióticos en la sobrevivencia de las bacterias, por lo tanto, su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos (Pérez-Cano and Robles-Contreras, 2013). La resistencia adquirida en cepas clínicas está involucrada en el fracaso terapéutico de los antibióticos (Fernández-Riverón *et al.*, 2003).

1.2.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Diversos mecanismos moleculares son los responsables de conferir resistencia a antibióticos en bacterias, ya sea intrínseca o adquirida (**Figura 2**); una misma bacteria puede presentar más de un mecanismo de forma simultánea (Balaban *et al.*, 2019; Blair *et al.*, 2015; Cabrera *et al.*, 2007; Pérez-Cano and Robles-Contreras, 2013; Wright, 2016):

- **Disminución de la entrada del antibiótico:** Modificaciones en los componentes de la envoltura celular o la pérdida o alteración de los canales de entrada pueden reducir la permeabilidad de la envoltura celular, limitando la entrada del antibiótico a la célula.

- **Expulsión activa del antibiótico:** La expresión de proteínas transmembranales (bombas de eflujo) inducen la expulsión continua del antibiótico una vez que ha ingresado a la célula, lo cual resulta en una baja concentración intracelular del antibiótico.

- **Inactivación del antibiótico:** Algunas proteínas o enzimas inactivan al antibiótico por modificar su estructura química o degradándolo.

- **Alteración del sitio blanco del antibiótico:** El sitio blanco, es decir, el sitio que reconoce y donde actúa el antibiótico, puede ser alterado por la generación de mutaciones genéticas o modificaciones post-traduccionales, de tal forma que ya

no será reconocido por el antibiótico. En algunas especies de bacterias como las del grupo de las micobacterias, el número de sitios blanco es incrementado para que la cantidad de moléculas del antibiótico sean sobrepasadas y el antibiótico no sea capaz de actuar sobre todas estas moléculas.

• **Disminución en la susceptibilidad de la célula a los antibióticos:** Expresión de estados fisiológicos específicos y transitorios que son menos susceptibles a la actividad de los antibióticos, como la generación de células persistentes o tolerantes, o la formación de biopelícula.

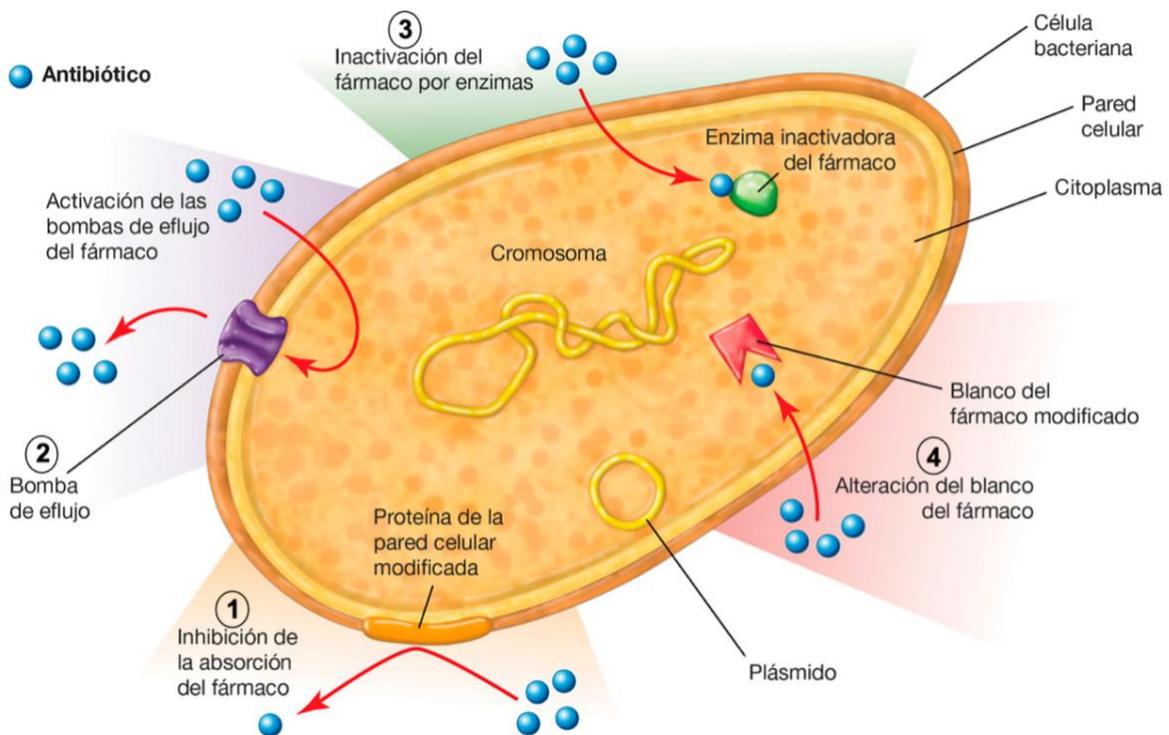


Figura 2. Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias. 1) Disminución de la entrada del antibiótico; 2) Expulsión activa del antibiótico; 3) Inactivación del antibiótico; 4) Alteración del sitio blanco del antibiótico (ver texto). Tomado de Uso Racional de Antibióticos, PDF (http://www.femeba.org.ar/documentos/download/3049?utm_medium=).

1.2.4 Transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias

La transferencia horizontal de genes es un proceso biológico que permite el intercambio o adquisición de nuevo material genético, es decir, foráneo (ya sea cromosomal o

plasmídico), entre diferentes especies de bacterias. En la naturaleza, la transferencia horizontal de genes puede ocurrir a través de tres mecanismos principales: conjugación, transducción o transformación (**Figura 3**). Además de los plásmidos, otros elementos genéticos móviles como los transposones, integrones o islas genómicas pueden actuar como vectores para la transmisión horizontal de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias (Partridge *et al.*, 2018).

La transferencia horizontal de genes adquiere gran relevancia en el contexto de la resistencia a antibióticos, ya que a través de este proceso, los mecanismos moleculares que confieren resistencia a antibióticos pueden ser diseminados rápidamente entre cepas patógenas y no patógenas de diferentes comunidades microbianas (Forsberg *et al.*, 2012).

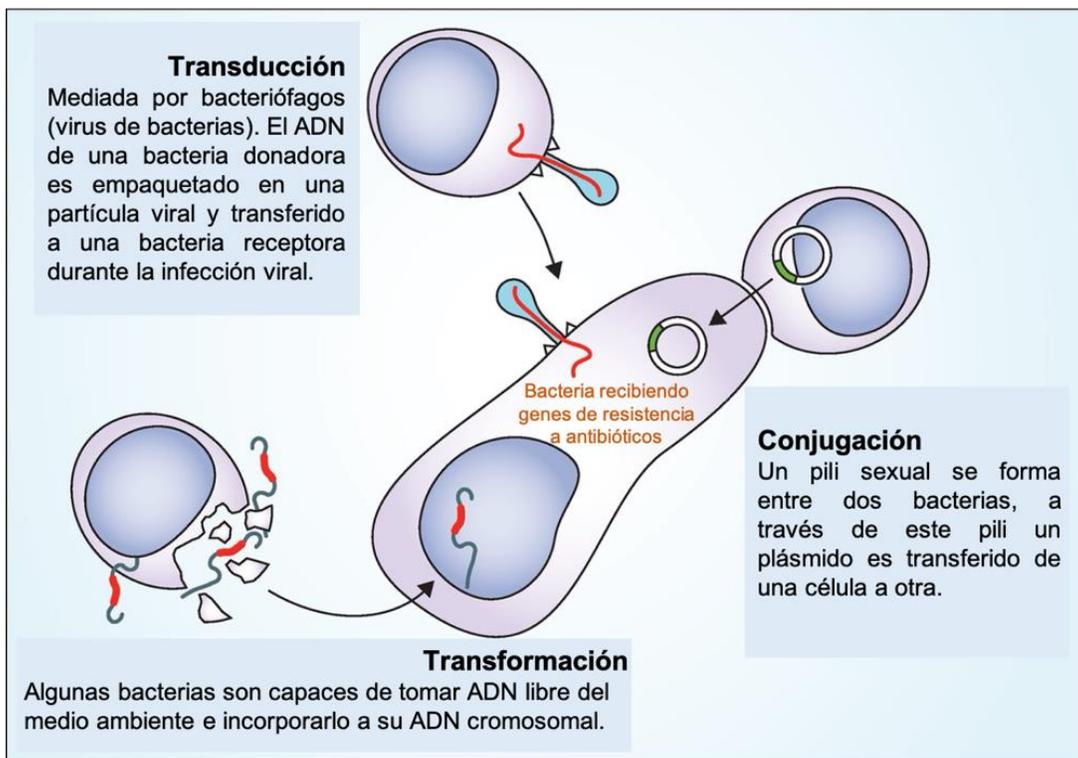


Figura 3. Mecanismos de transferencia horizontal de genes y su papel en la adquisición de genes asociados con la resistencia a antibióticos en bacterias. Los genes que confieren resistencia a antibióticos pueden estar codificados en ADN cromosomal o en ADN plasmídico. Las bacterias patógenas o comensales pueden adquirir estos genes asociados con la resistencia a antibióticos a través de diferentes mecanismos de transferencia horizontal de genes: conjugación, transformación o transducción. Modificado de Holmes *et al.* (2016).

1.3 Crisis actual por la resistencia a antibióticos

Hoy en día, muchos de los antibióticos que son recetados clínicamente han perdido su eficacia contra un número cada vez mayor de cepas bacterianas, por lo que la resistencia a antibióticos restringe las opciones terapéuticas para erradicar bacterias patógenas. Como consecuencia, amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de numerosas infecciones de origen bacteriano, por lo que enfermedades antiguamente curables, podrían volver a ser incurables y algunas de ellas incluso mortales (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>).

Ante la ausencia de una erradicación exitosa, en pacientes contagiados con bacterias patógenas resistentes a antibióticos, las bacterias pueden permanecer en los organismos durante periodos más largos de tiempo, en comparación con las bacterias patógenas susceptibles a antibióticos, un hecho que aumenta el riesgo de su transmisión, además de generar un aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad (Aslam *et al.*, 2018). En el caso de que dichos pacientes sean ingresados, pueden requerir tiempos de hospitalización más amplios, lo que incrementa los gastos médicos tanto para el enfermo como para los sistemas de salud gubernamentales (Aslam *et al.*, 2018).

Diversas organizaciones de salud como la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO, por sus siglas en inglés, *World Health Organization*), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EUA (CDC, por sus siglas en inglés, *Centers for Disease Control and Prevention*), la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, por sus siglas en inglés, *Infectious Diseases Society of America*), y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés, *European Centre for Disease Prevention and Control*), consideran a la resistencia a antibióticos como un problema mundial que amenaza la salud pública. Asimismo, se ha proyectado que podría originar secuelas catastróficas comparables a las provocadas por el cambio climático (Roope *et al.*, 2019). En 2013, la resistencia a antibióticos fue declarada un riesgo global por el Foro Económico Mundial (WEF, 2013) y en 2019, la OMS la enumeró dentro de los 10 desafíos prioritarios que tiene que enfrentar en materia

de salud (<https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/ten-threats-to-global-health-in-2019>).

En la actualidad, las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos ocasionan la muerte de al menos 700,000 personas al año a nivel mundial, de continuar esta tendencia, se ha estimado que en el año 2050 provocarán 10 millones de defunciones, convirtiéndose en una de las primeras causas de muerte (O'Neill, 2014). Además de la tasa de mortalidad, la carga de estas infecciones también se ha medido en años de vida ajustados por discapacidad (AVAD o DALY, por sus siglas en inglés, *Disability-Adjusted Life Years*). Los AVAD son una medida que representa la carga de una enfermedad, expresada como el número de años perdidos debido a la falta de salud, discapacidad o muerte prematura. En 2015, en Europa y EUA, las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos significaron una incidencia promedio de 170 AVAD por cada 100,000 habitantes (Cassini *et al.*, 2019). En comparación, este valor fue equivalente al obtenido de la suma de los AVAD de tres de las principales enfermedades infecciosas: influenza, tuberculosis y SIDA, el cual fue de 183 AVAD/100,000 habitantes (Cassini *et al.*, 2019).

1.4 Selección de bacterias resistentes a antibióticos

La resistencia a antibióticos es un proceso de evolución natural de las bacterias que está influenciado tanto por la presión de selección que ejercen dichos compuestos sobre las células bacterianas, como por características biológicas innatas de estos microorganismos, como son su plasticidad genética y su alta tasa de replicación. No obstante, ciertos factores antropogénicos han contribuido de manera significativa a la rápida selección y proliferación de bacterias resistentes, entre ellos, el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en la medicina humana y otros entornos (Holmes *et al.*, 2016). Originalmente los antibióticos se comercializaron para curar infecciones de tipo bacteriano en humanos, sin embargo, con el tiempo su uso se extendió a otros ambientes no clínicos, incrementando el manejo inadecuado y/o en grandes cantidades de estos fármacos. Algunos de los ambientes no clínicos que favorecen la generación de bacterias

resistentes a antibióticos son la acuicultura (Cabello, 2006; Heuer *et al.*, 2009), la agricultura (McManus *et al.*, 2002; Stockwell and Duffy, 2012), la medicina veterinaria para mascotas (Guardabassi and Prescott, 2015; Rantala *et al.*, 2004) y principalmente el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en animales de producción. Adicionalmente, algunos mecanismos de resistencia a antibióticos pueden haber surgido en ecosistemas naturales y posteriormente haber pasado al ambiente hospitalario (Martínez, 2009).

Debido a que los antibióticos se usan de manera intensiva en distintos contextos (no sólo clínicos), bacterias comensales (no patógenas) también pueden estar constantemente expuestas a grandes concentraciones de antibióticos, favoreciendo su selección y la generación de bacterias resistentes. Por lo tanto, la resistencia a antibióticos no sólo se presenta en bacterias patógenas de interés clínico, sino que también puede encontrarse en bacterias comensales que forman parte de la microbiota de humanos y animales (principalmente la microbiota intestinal) y de otros ecosistemas (alimentos, suelo, agua, etc.) (Torres-Manrique, 2012).

1.4.1 Uso de antibióticos en la salud humana

En la clínica, los antibióticos están entre los fármacos que se prescriben con más frecuencia en el mundo (CDC, 2013). Una cantidad considerable de antibióticos se receta a pacientes hospitalizados, pero la mayor cantidad se administra a pacientes ambulatorios que asisten a unidades de atención primaria de salud (ECDC, 2012; Goossens *et al.*, 2005; Suda *et al.*, 2013). Se ha determinado que hasta en un 60% de los casos, los antibióticos se recetan innecesariamente (Fleming-Dutra *et al.*, 2016; Hecker *et al.*, 2003; Luyt *et al.*, 2014; O'Neill, 2015b) y que las indicaciones para el tratamiento, la duración de la terapia o la elección del antibiótico que se prescribe, son inadecuadas en un 30-50% de los casos, lo que ocasiona una falta de efectividad de estos fármacos (Fridkin *et al.*, 2014; Ohl and Luther, 2011). Además, otro factor que acrecienta el consumo innecesario de antibióticos en muchas partes del mundo es que estos medicamentos pueden adquirirse aún sin ser prescritos por el personal de salud, es decir, sin una orden médica.

1.4.2 Uso de antibióticos en animales del sector pecuario

A pesar de que algunos países como México han buscado disminuir el consumo de antibióticos en humanos a través de su venta exclusivamente con receta médica, en la medicina veterinaria los antibióticos se suministran bajo un esquema menos regulado y/o vigilado y además para usos no terapéuticos (INSP, 2010).

En la veterinaria, los antibióticos se emplean en animales de compañía o mascotas, sin embargo, es en los animales del sector pecuario, es decir, aquéllos que son criados para consumo humano (aves, bovinos, ovinos, cerdos, etc.), donde se administra la mayor cantidad de estos fármacos. En dichos animales, los antibióticos no sólo se administran con fines terapéuticos (a diferencia de lo que ocurre en humanos y mascotas, donde en la mayoría de los casos se emplean para curar enfermedades), sino que también se utilizan constantemente como promotores de crecimiento, como profilácticos y en metafilaxis (administración masiva de antibióticos a una manada de animales) (Mathew *et al.*, 2007). Para tales fines, los antibióticos son administrados de manera constante y en dosis sub-terapéuticas a lo largo de casi toda la vida de los animales, generando un ambiente propicio para la selección de bacterias resistentes a antibióticos (INSP, 2010). Al ser usados como promotores de crecimiento, los antibióticos se administran como aditivos en el alimento o pienso de los animales, con el propósito de aumentar su producción y engorde (Torres and Zarazaga, 2002).

Otra problemática es que algunos antibióticos que son suministrados como aditivos en el alimento de animales del sector pecuario, también son recetados para curar infecciones en seres humanos, ocasionando que la microbiota de estos dos nichos, animales y humanos, esté sujeta a la presión selectiva de los mismos antibióticos (Mathew *et al.*, 2007; Torres and Zarazaga, 2002). Lo anterior, aumenta la probabilidad de que cepas patógenas resistentes a antibióticos usados en la clínica proliferen en animales y a partir de estos se propaguen hacia los seres humanos, lo que genera un importante riesgo para la salud pública (Torres and Zarazaga, 2002).

Cabe resaltar que alrededor del 60% de todas las enfermedades infecciosas en humanos son zoonóticas (transmitidas naturalmente desde animales domésticos o silvestres al ser humano), así como el 75% de todas las enfermedades infecciosas emergentes (Taylor *et al.*, 2001). Por lo tanto, la resistencia a los antimicrobianos es un factor que complica el control y la prevención de las zoonosis (<https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/zoonoses>).

El uso de antibióticos como agentes profilácticos y como promotores de crecimiento en animales del sector pecuario ha causado que en algunos países las cantidades de antibióticos suministradas en este sector superen por mucho las que se utilizan en humanos (Hollis and Ahmed, 2013; O'Neill, 2015a; Van Boeckel *et al.*, 2014). Por ejemplo, en una estimación del consumo anual de antibióticos en Estados Unidos de América (EUA) se determinó que casi el 80% del total de estos fármacos se suministraron en animales del sector pecuario, mientras que menos del 20% fueron usados por seres humanos (Hollis and Ahmed, 2013) (**Figura 4**).

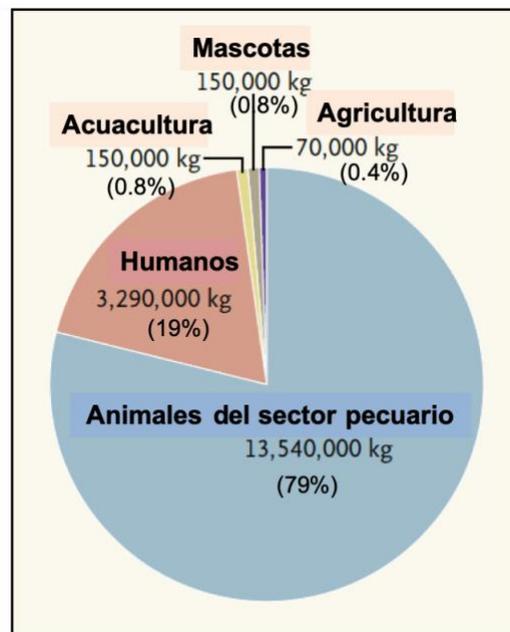


Figura 4.- Uso estimado de antibióticos durante un año en Estados Unidos de América (EUA). Los datos se muestran como la cantidad aproximada de antibióticos en kilogramos (kg) y porcentaje del total (%) que fueron administrados durante un año en EUA en animales del sector pecuario, en humanos, en la acuicultura, en mascotas o en la agricultura. Modificado de Hollis and Ahmed (2013).

En varios otros países, el porcentaje de antibióticos administrado anualmente en animales de consumo humano es similar al estimado en EUA, siendo aproximadamente del 70% (O'Neill, 2015a). A nivel mundial, China es el país que mayor cantidad de antibióticos administra en los animales de consumo, mientras que Estados Unidos ocupa el segundo lugar, seguido de Brasil (Van Boeckel *et al.*, 2015). De manera alarmante, de acuerdo con una proyección realizada en 2015, en el año 2030 México estará entre los cinco países de economías emergentes que mayor cantidad de antibióticos administren en animales del sector pecuario (Van Boeckel *et al.*, 2015).

1.5 Diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y de genes que confieren resistencia a antibióticos en la naturaleza

Una vez que sucede la selección y proliferación de bacterias resistentes a antibióticos en distintos ambientes, tanto clínicos como no clínicos, estas bacterias pueden diseminarse entre los organismos y el medio ambiente a través de múltiples vías (**Figura 5**).

En poblaciones humanas, la exposición y/o infección con bacterias resistentes a antibióticos puede ocurrir por el contacto con personas portadoras, ya sea en entornos de atención médica (clínicas, hospitales) o comunitarios; animales del sector pecuario también pueden adquirir bacterias resistentes a antibióticos como resultado de la proximidad entre ellos al compartir espacios de crianza (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018; Woolhouse and Ward, 2013). Asimismo, la transferencia de bacterias resistentes a antibióticos puede ocurrir de humanos hacia animales (de granja o de compañía) o viceversa. La transmisión de bacterias farmacorresistentes de animales a humanos puede ser directa, mediante el contacto entre ellos, o indirecta, por el consumo de alimentos derivados de animales que portan bacterias resistentes a antibióticos (Weiman, 2016; Woolhouse and Ward, 2013) (**Figura 5**). En animales, incluidos los humanos, el tracto gastrointestinal es uno de los principales ambientes que son reservorio de bacterias resistentes a antibióticos, las cuales al ser depositadas junto con el excremento pueden contaminar suelos, aguas (ríos, lagos, mares), cultivos agrícolas, etc. (Nnadozie and Odume, 2019; Woolhouse and Ward, 2013; Xiong *et al.*, 2018) (**Figura 5**). Los cultivos

agrícolas que reciben aspersión con antibióticos para tratar o prevenir el desarrollo de infecciones en las plantas, así como aquéllos cultivos que son regados con aguas o abonados con estiércol contaminados con bacterias resistentes a antibióticos, posteriormente sirven de alimento para los seres humanos o los animales, por lo que constituyen otra fuente potencial de adquisición de bacterias farmacorresistentes (Stockwell and Duffy, 2012; Woolhouse and Ward, 2013) (Figura 5). Las aguas residuales de hogares, hospitales o plantas de fabricación de antibióticos constituyen otra fuente de diseminación de bacterias resistentes a antibióticos al ambiente.

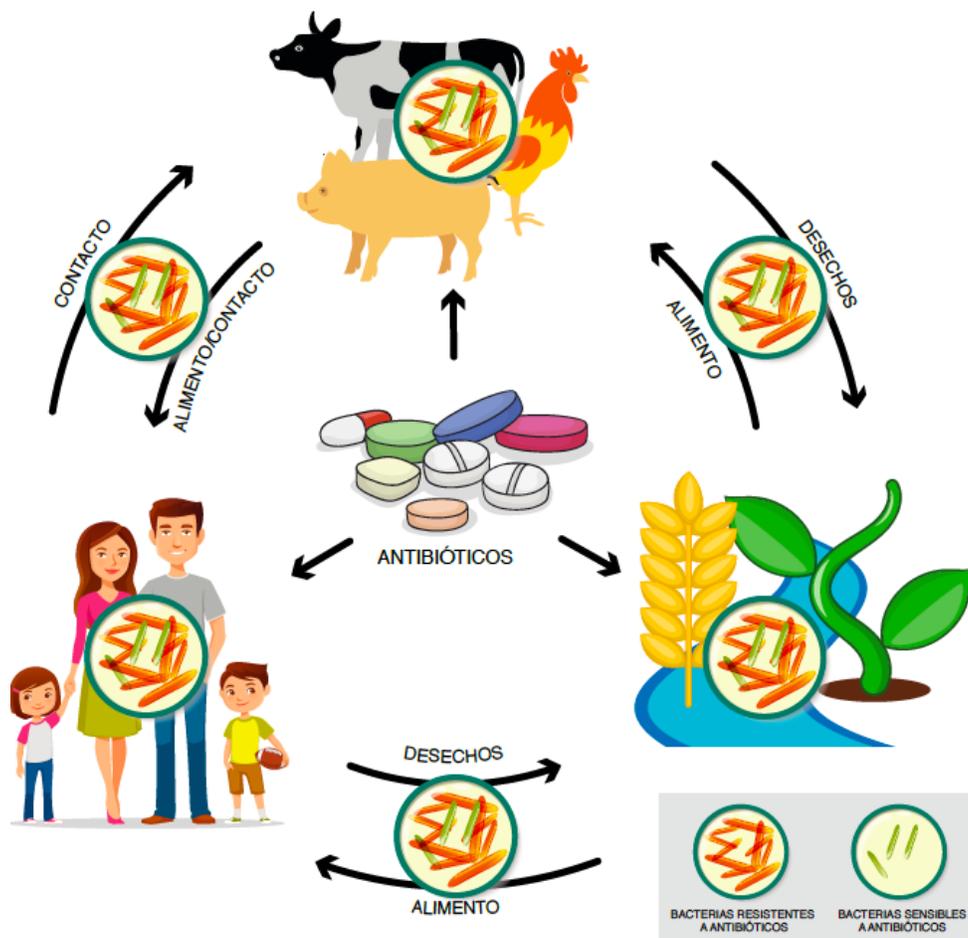


Figura 5.- Selección y transmisión de bacterias resistentes a antibióticos en la naturaleza. El uso excesivo e inadecuado de antibióticos en humanos, animales y cultivos agrícolas, ha seleccionado bacterias resistentes a antibióticos, las cuales pueden transmitirse entre humanos, animales y el medio ambiente a través de múltiples vías. Tomado de Pérez Morales and Bustamante Santillán (2018).

Al transitar por distintos ambientes y hospederos, las bacterias resistentes a antibióticos pueden diseminar material genético asociado con la resistencia a fármacos a través de eventos de transferencia horizontal de genes, promoviendo la propagación de mecanismos de resistencia a antibióticos (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Por ejemplo, se han encontrado los mismos genes que confieren resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de animales y de humanos (Wang *et al.*, 2018). Por otra parte, las bacterias receptoras de material genético asociado con la resistencia a antibióticos pueden ser causantes de enfermedades (patógenas) o inofensivas (comensales), e incluso pueden tener poca relación filogenética con las bacterias donadoras (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Por lo tanto, existe un flujo e intercambio de bacterias resistentes y de genes de resistencia entre los diferentes ecosistemas (humano, animal, terrestre, acuático, etc.) (Cantón, 2009). También se ha reportado la presencia de genes de resistencia a antibióticos en el aire de las grandes metrópolis alrededor del mundo (Li *et al.*, 2018).

1.6 Importancia de la implementación de programas de vigilancia de bacterias resistentes a antibióticos en ambientes no clínicos

Desde hace ya varios años, diversas organizaciones internacionales han encomendado realizar un abordaje integral al problema de la resistencia a antibióticos (INSP, 2010). Así, la OMS, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) han colaborado en el desarrollo de acciones que faciliten la implementación del concepto UNA SALUD (*One Health* en inglés) en el contexto de la resistencia antimicrobiana, con el fin de controlar los riesgos sanitarios en la interfaz hombre-animal-medio ambiente. Dicho concepto enfatiza que la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y que están conectadas a los ecosistemas en los cuales cohabitan, por lo que el uso de antibióticos o la presencia de bacterias farmacorresistentes en un nicho ecológico inevitablemente trascenderá hacia los demás nichos (<https://www.oie.int/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/una-sola-salud/>). Por esto, resulta de gran importancia monitorear la resistencia a antibióticos a través de bacterias indicadoras no sólo en ambientes clínicos, sino también en entornos no humanos, como por ejemplo los ecosistemas animales.

Debido al riesgo que supone el potencial de transmisión de bacterias resistentes a antibióticos desde animales hacia humanos, el monitoreo de la farmacorresistencia en la microbiota de animales que son utilizados para el consumo humano es de gran relevancia. La importancia de la generación de conocimiento que determine la circulación de la resistencia a antibióticos en humanos y animales es destacada en el Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos emitido por la OMS en 2015 (OMS, 2016).

En 2017, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria o EFSA (por sus siglas en inglés, *European Food Safety Authority*) y el ECDC publicaron un reporte sobre resistencia antimicrobiana en bacterias indicadoras y bacterias zoonóticas aisladas de humanos, animales y alimentos (EFSA and ECDC, 2017). En dicho informe se especifica que *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. no tifoideas, *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter* spp. son usadas para establecer de forma confiable la correlación entre bacterias procedentes de fuentes no humanas (animales y alimentos) y su riesgo de transmisión a seres humanos. De estas, *E. coli* comensal ha sido ampliamente utilizada como especie centinela o indicadora de farmacorresistencia porque representa un reservorio de genes de resistencia a antibióticos, los cuales puede transferir a otras bacterias, incluyendo patógenos (EFSA and ECDC, 2019). Adicionalmente, las bacterias comensales de fuentes no humanas en sí mismas pueden ser patógenos en huéspedes inmunodeprimidos. Cabe señalar que no es necesario demostrar la transmisión de tales organismos o sus genes; se considera que basta que exista el potencial de que se produzca esa transmisión (AGISAR, 2018). Por lo tanto, *E. coli* comensal farmacorresistente es uno de los principales indicadores para estimar la carga de la resistencia a antibióticos en animales y otros sectores desde la perspectiva de Una Salud (Poirel et al., 2018).

1.7 Características generales de *Escherichia coli*

E. coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram-negativo, no esporulado, móvil, facultativo, oxidasa negativo, reductor de nitritos, fermenta la glucosa

con producción de ácido y gas y su serotipificación se realiza con base en la presencia de tres antígenos: antígeno O (somático de la pared celular), antígeno H (flagelar) y antígeno K (de superficie) (Fernández Ferrán et al., 2003).

E. coli es una bacteria que habitualmente se encuentra formando parte de la microbiota de animales vertebrados e invertebrados. A pesar de que predomina principalmente como especie comensal, también presenta patotipos patógenos que pueden ocasionar enfermedades graves en humanos y animales (Rodríguez-Angeles, 2002). Las cepas patógenas de *E. coli* se dividen en *E. coli* intestinal (InPEC) y *E. coli* extraintestinal (ExPEC). Las cepas intestinales son patógenos obligados que producen infecciones del tracto gastrointestinal y diarreas y de acuerdo con su cuadro clínico se clasifican en seis patotipos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica, también conocidas como productoras de toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherente difusa (DAEC) (Rodríguez-Angeles, 2002). El mecanismo de patogénesis que ocasiona la diarrea es variable y depende del patotipo de *E. coli* que infecte al individuo, pero puede estar relacionado con la producción de enterotoxinas, citotoxinas, la invasividad y la adherencia a la superficie de la mucosa, lesionando las células intestinales o alterando la función del intestino (Fernández Ferrán et al., 2003).

Las infecciones que *E. coli* produce fuera del tracto gastrointestinal (extraintestinales) son de tipo oportunistas. Dentro de este grupo de cepas se encuentra *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* patógeno aviar (APEC), ésta última infectando únicamente a aves. En aves de corral, APEC causa colibacilosis, la cual inicia frecuentemente en el tracto respiratorio debido a la inhalación de polvo fecal, antes de extenderse en todo el cuerpo, causando septicemia o pericarditis, hasta provocar la muerte del ave (Guabiraba and Schouler, 2015).

Las diferentes cepas de *E. coli* presentan una gran variabilidad genética, actualmente existen ocho grupos filogenéticos o filogrupos reconocidos, siete pertenecientes a *E. coli sensu stricto* (A, C, B1, B2, D, E y F) y uno perteneciente al Clado I del género

Escherichia. Esta clasificación se basa en la presencia/ausencia de cuatro marcadores genéticos: los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y el fragmento TspE4.C2 (Clermont et al., 2013). Los distintos filogrupos de *E. coli* se han asociado con la capacidad virulenta de las cepas, encontrándose que la gran mayoría de las cepas patógenas que causan infecciones extraintestinales pertenecen a los filogrupos B2 y D, mientras que las cepas de *E. coli* que poseen una baja capacidad virulenta y son en su gran mayoría comensales, se agrupan en los filogrupos A y B1; las cepas patógenas que causan infecciones intestinales se distribuyen en los diferentes filogrupos, aunque en menor medida en A y B1 (Clermont et al., 2000).

1.7.1 Genes de resistencia a antibióticos localizados en plásmidos en cepas de *E. coli* aisladas de animales

La obtención y el mantenimiento de mecanismos de resistencia a antibióticos en el genoma bacteriano pueden ser el resultado de diversos eventos genéticos. Entre estos eventos se encuentran la acumulación de mutaciones y la adquisición de elementos genéticos móviles como plásmidos, casetes, transposones y/o integrones que transportan genes cuyos productos confieren resistencia a antibióticos. De estos mecanismos, la adquisición de plásmidos (principalmente por conjugación) es el más frecuente, facilitando la movilidad de genes asociados con la resistencia a antibióticos entre diferentes especies de bacterias, incluso entre microorganismos filogenéticamente distantes (Bennett, 2008).

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena que constituyen una unidad de replicación independiente del cromosoma, se puede encontrar más de una copia del mismo plásmido dentro de una bacteria, sus tamaños varían, pero los más comunes tienen entre 2,000-300,000 pares de bases (Bennett, 2008; Madec and Haenni, 2018). Muchos plásmidos también llevan su propio grupo de genes para la autotransmisibilidad por conjugación, aunque los plásmidos que carecen de genes de transferencia conjugativa también pueden transmitirse a otras bacterias con la ayuda de un plásmido conjugativo co-residente (Bennett, 2008). Los plásmidos pueden proporcionar uno o más beneficios funcionales al huésped, como factores genéticos

asociados con la resistencia a antibióticos, funciones asociadas con la degradación de xenobióticos o factores de virulencia (Bennett, 2008).

Durante los últimos años se ha identificado un número cada vez mayor de determinantes de resistencia a antibióticos en los genomas de cepas de *E. coli* aisladas de animales (Poirel et al., 2018). Muchos de estos genes de resistencia han sido adquiridos por *E. coli* mediante eventos de transferencia horizontal, donde los plásmidos actúan como un vehículo principal. En la Tabla 1 se enlistan los genes de resistencia a antibióticos que se localizan en plásmidos en diferentes cepas de *E. coli* aisladas de animales alrededor el mundo (Poirel et al., 2018).

Tabla 1.- Genes de resistencia a antibióticos presentes en plásmidos en cepas de *E. coli* aisladas de animales (Poirel et al., 2018).

Familia de Antibiótico	Gen de resistencia	Hospedero
β -lactámicos	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-12}	Cerdos, aves de corral, bovinos
Cefalosporinas	<i>bla</i> _{CMY-2}	Carne de ave, aves de corral, perros
Carbapenemasas	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{NDM-5} , <i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{IMP-4} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-181} , <i>bla</i> _{KPC-2}	Perros, gatos, cerdos, aves de corral, vacas, patos
Quinolonas y fluoroquinolonas	<i>qnr</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qepA</i> , <i>qnrS1</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrS1</i> , <i>qnrB1</i> , <i>qnrB4</i> , <i>qnrB10</i>	Aves de corral, cerdos
Aminoglucósidos	<i>arma</i> , <i>rmtB</i> , <i>fosA3</i>	Cerdo, aves de corral
Fosfomicina	<i>fosA</i> , <i>fosA3</i>	Animales de compañía, cerdos, pollos
Tetraciclina	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>tet(E)</i> , <i>tet(G)</i> , <i>tet(J)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(Y)</i> , <i>tet(M)</i> y <i>tet(W)</i>	Bovinos

2. ANTECEDENTES

En México, una de las actividades pecuarias más desarrolladas y productivas es la avicultura. Aguascalientes, Estado de México, Guanajuato, Jalisco, Puebla y Querétaro centralizan el 46% del total de la producción de pollo de engorda; Chiapas, Veracruz y Yucatán contribuyen con el 25%; La Laguna y Nuevo León producen el 13%; mientras que el 16% restante se distribuye en las dos terceras partes del país; en la obtención de huevo, el 80% de su producción se concentra en cinco estados (Quintana López, 2018).

A nivel mundial, nuestro país ocupa el primer lugar en consumo per cápita de huevo y el cuarto como productor; como productor de pollo de engorda nos encontramos en el sexto lugar. Anualmente, en México se producen 6,000,000 de toneladas de productos avícolas, cuyo monto supera los 130,000 millones de pesos mexicanos, por lo que excluyendo la leche de vaca, sólo la avicultura contribuye con aproximadamente el 64% de la producción pecuaria nacional (34.3% pollo, 29.4% huevo y 0.1% pavo) (Quintana López, 2018).

Los sistemas intensivos y la avicultura de traspatio son dos de los sistemas que actualmente se utilizan en la producción de aves. Los sistemas intensivos se desarrollan en grandes empresas avícolas industrializadas y se caracterizan por contar con animales genéticamente mejorados, altas densidades de animales en confinamiento, instalaciones tecnificadas y una alimentación balanceada (Molina Martínez, 2013).

Por otro lado, el traspatio es aquel espacio que se caracteriza por la crianza de un conjunto de animales como bovinos, ovinos, cerdos, aves y otros, que se explotan en los patios de las casas habitación o alrededor de las mismas, principalmente de zonas rurales y áreas peri-urbanas (Cuca-García et al., 2018). La importancia relativa de los traspatios en los indicadores económicos de nuestro país es difícil de cuantificar (Cuca-García et al., 2018). No obstante, un estudio de 1998 reveló que la avicultura de traspatio representa hasta el 10% de la producción avícola nacional (Lastra et al., 1998).

La producción avícola de traspatio es de gran importancia para la seguridad alimentaria, la organización y economía familiar debido a que genera alimentos, ahorro e ingresos (Cuca-García et al., 2018; Jaramillo-Villanueva et al., 2017). En México, más del 75% de las familias rurales realizan una producción de traspatio siguiendo métodos tradicionales de reproducción, manejo y mantenimiento, ocupando la fuerza de trabajo de las amas de casa, ancianos y niños y puede generar hasta el 9.3% del ingreso familiar (Cuca-García et al., 2018; Gutiérrez-Triay et al., 2007; Jaramillo-Villanueva et al., 2017). De las familias rurales con animales de traspatio en México, más del 90% poseen aves, principalmente gallinas, debido a su corto ciclo de producción y bajo costo, las cuales son alimentadas con desechos de comida o por pastoreo (Gutiérrez-Triay et al., 2007).

Una característica importante en la producción de traspatio es que, a diferencia de los sistemas intensivos, no existen normas de bioseguridad para las personas que cuidan de los animales. Adicionalmente, el manejo sanitario de los animales es escaso o nulo, pues no se cuenta con servicios de medicina preventiva adecuados ni acceso a la atención veterinaria. En un estudio realizado en 2007 se reportó que en Yucatán, sólo el 13.3% de las personas encuestadas vacunan a sus aves (Gutiérrez-Triay et al., 2007).

Es evidente la importancia de la producción avícola en nuestro país, tanto por las grandes cantidades de huevo y pollo consumidas por la población, como por las diferencias en los sistemas de producción, donde el traspatio ha logrado mantenerse a lo largo de tiempo.

La proximidad de los animales de traspatio con las familias conduce a un frecuente contacto humano directo con aves vivas, especialmente de individuos de alto riesgo, incluyendo poblaciones pediátricas (<5 años de edad) y geriátricas (>65 años de edad), lo cual aumenta significativamente el riesgo de exposición humana a una variedad de cepas bacterianas zoonóticas y transmitidas por los alimentos, así como a sus variantes farmacorresistentes (Shah et al., 2020). Esto plantea la necesidad urgente de vigilar a las aves de corral sanas que se producen en los traspatios para detectar la prevalencia de cepas comensales de *E. coli* resistentes a antibióticos. Como se mencionó anteriormente, *E. coli* pueden ser portadoras de resistencia adquirida o intrínseca a los antibióticos de

importancia clínica y probablemente sirvan como reservorios de determinantes de resistencia que pueden contribuir a la persistencia y diseminación de la resistencia a los antibióticos.

En México, los pocos estudios que existen sobre la prevalencia de bacterias farmacorresistentes (*Campylobacter* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*) asociadas a ambientes no humanos se han realizado en animales pecuarios enfermos, animales sacrificados en rastros o a partir de alimentos (Aguilar-Montes de Oca et al., 2015; Camacho Rábago et al., 2010; Del Rio-Avila et al., 2016; Jiménez Mejía et al., 2017; López-Vázquez et al., 2015; Nayarit-Ballesteros et al., 2016; Reyes-Rodriguez et al., 2013; Varela-Guerrero et al., 2013; Varela-Ortiz et al., 2018; Zaidi et al., 2012). Sin embargo, estudios sistemáticos para determinar la ocurrencia de cepas comensales de *E. coli* resistentes a antibióticos o sus mecanismos de propagación de determinantes de resistencia en las aves de corral de traspatio son muy escasos en nuestro país. En consecuencia, la ecología, la epidemiología y los riesgos para la salud pública asociados a la transmisión de dichas bacterias o genes de las aves de corral de traspatio a los seres humanos siguen siendo poco conocidos. Por lo tanto, en este proyecto se planteó determinar la prevalencia de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio de diferentes municipios del estado de México, así como determinar si la resistencia a antibióticos está asociada a la presencia de plásmidos.

3. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, la persistencia y propagación de bacterias multirresistentes a antibióticos, así como la diseminación de los determinantes genéticos asociados a esta resistencia tanto en ambientes clínicos como en entornos no clínicos representan un riesgo significativo para la salud pública. En consecuencia, es necesario realizar la vigilancia de estas bacterias y de la potencial movilización de los elementos genéticos que confieren resistencia a antibióticos en diversos entornos, entre los que destacan el contexto de los animales usados para consumo humano.

En algunas zonas rurales y periurbanas de México, la avicultura de traspatio es una actividad económica primordial que frecuentemente involucra el contacto humano directo con aves vivas, lo cual incrementa significativamente el riesgo de adquisición de bacterias zoonóticas o bacterias transmitidas por alimentos, entre las que se pueden encontrar cepas resistentes a antibióticos. Esto plantea una urgente necesidad de monitorear la prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos en aves criadas en traspatios, ya que dichas bacterias, o los determinantes genéticos asociados con la farmacorresistencia que portan, representan una amenaza para los seres humanos. Actualmente, existe una considerable ausencia de conocimiento sobre la frecuencia de la multirresistencia a antibióticos ligada a animales criados en traspatio en nuestro país y con este trabajo esperamos contribuir a generar parte de esta información.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio presentarán resistencia a antibióticos asociada a plásmidos.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si en cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio existen elementos genéticos móviles como plásmidos que confieren resistencia a antibióticos.

Objetivos específicos

- Determinar cuantitativamente el perfil de resistencia/susceptibilidad a los antibióticos ampicilina, cefoperazona, ciprofloxacina, colistina y tetraciclina, en 40 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio.
- Analizar el perfil de plásmidos de las cepas de *E. coli* multirresistentes a antibióticos en estudio.
- Correlacionar la presencia de plásmidos con los fenotipos de resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* en estudio.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas de *E. coli* analizadas

Las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron donadas por el Dr. Martín Talavera Rojas, Investigador del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Previamente, el grupo de trabajo del Dr. Talavera realizó un muestreo en aves criadas en los traspatios de viviendas situadas en áreas rurales y peri-urbanas de cuatro municipios de la región norte del Estado de México: Atlacomulco, El Oro, Jocotitlán e Ixtlahuaca (Talavera-González *et al.*, 2021). Las muestras fueron tomadas con un hisopo a partir de la cloaca de aves aparentemente sanas, cada hisopo se colocó en medio de transporte de Stuart y se mantuvo a 4°C hasta su arribo al laboratorio. Una vez en el laboratorio, para seleccionar a los aislados de *E. coli*, las muestras se inocularon en placas de agar MacConkey y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente, a partir de cada placa donde hubo crecimiento, se seleccionaron colonias aisladas que tuvieran una morfología similar a *E. coli* y se les realizaron pruebas bioquímicas convencionales (agar triple azúcar hierro, agar lisina hierro, medio de sulfuro indol para movilidad y agar citrato de Simmons). Finalmente, la identificación de las cepas fue confirmada por la amplificación (PCR) del gen *uidA*, el cual codifica para la enzima beta-glucuronidasa (Heijnen and Medema, 2006). En total, se obtuvo una colección de 192 cepas de *E. coli*, de las cuales 89 provienen de Atlacomulco, 39 de El Oro, 33 de Jocotitlán y 31 de Ixtlahuaca.

En el presente trabajo se estudiaron 40 de las 192 cepas de *E. coli* aisladas, las cuales representan aproximadamente el 20% del total de cepas aisladas inicialmente de las aves de traspatio. Los nombres de las 40 cepas utilizadas se enlistan a continuación, las cuales se clasificaron de acuerdo con el municipio del cual proviene cada aislamiento:

- **Atlacomulco (18 cepas):** A1, A2, A3, A4, A12, A17, A24, A32, A38, A43, A51, A56, A61, A68, A70, A79, A83 y A89.
- **Jocotitlán (7 cepas):** J1, J3, J10, J11, J15, J24 y J40.
- **Ixtlahuaca (7 cepas):** L1, L2, L3, L4, L7, L16 y L26.
- **El Oro (8 cepas):** O1, O2, O3, O4, O5, O8, O17 y O26.

6.2 Preparación de medios de cultivo

Caldo de cultivo Mueller-Hinton (MH): Disolver 38 g del medio (DIFCO DB) en 1 L de agua milli Q, mezclar mediante agitación y esterilizar a 121°C durante 20 min.

Caldo de cultivo Lysogeny Broth (LB): Disolver 10 g de triptona (DIFCO), 5 g de extracto de levadura (DIFCO) y 10 g de cloruro de sodio (JT Baker) en 1 L de agua milli Q, mezclar mediante agitación y esterilizar a 121°C durante 20 min.

Agar LB: Disolver 10 g de triptona (DIFCO), 5 g de extracto de levadura (DIFCO), 10 g de cloruro de sodio (JT Baker) y 15 g de agar (DIFCO) en 1 L de agua milli Q, mezclar mediante agitación y esterilizar a 121°C durante 20 min.

Medio CAMHB (*Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth*): Es el caldo MH ajustado con cationes. Una vez que el medio MH esté esterilizado y temperado a temperatura ambiente, adicionar 2.07 ml de la solución “stock” de calcio (10 mg Ca⁺⁺/ml agua milli Q) y 0.87 ml de la solución “stock” de magnesio (10 mg Mg⁺⁺/ml agua milli Q) a 1 L de MH.

6.3 Determinación cuantitativa de susceptibilidad/resistencia a antibióticos

La susceptibilidad de las cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio a varios antibióticos fue determinada por el Dr. Talavera y sus colaboradores usando el método semi-cuantitativo de difusión de disco (Talavera-González *et al.*, 2021). En el presente trabajo se utilizó un método cuantitativo para evaluar la susceptibilidad de los aislados de *E. coli* a cinco antibióticos que pertenecen a distintas familias: ampicilina (beta-

lactámicos), cefoperazona (cefalosporinas), ciprofloxacina (fluoroquinolonas), colistina (polimixinas) y tetraciclina (tetraciclinas).

La prueba utilizada para determinar la resistencia/susceptibilidad de los aislados de *E. coli* a los distintos antibióticos fue el método de microdilución en caldo, siguiendo las especificaciones descritas en el manual M100 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 27th Edition, 2017, publicado por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2017). El método de microdilución en caldo es un método cuantitativo en el cual se utilizan diluciones seriadas (dobles) del antimicrobiano a evaluar para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) expresada en $\mu\text{g/ml}$. La CMI se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano. En el manual M100 se tienen establecidos los puntos de corte de la CMI y su interpretación para distintos antibióticos. Los criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos están basados en la respuesta *in vitro* de un microorganismo a un agente antibiótico con niveles alcanzados en sangre o tejidos del antimicrobiano dosificado. Por lo tanto, si se observa o no crecimiento bacteriano a determinadas concentraciones, las cepas se clasifican como susceptibles, de resistencia intermedia o resistentes. El CLSI define a los fenotipos como:

- **Susceptible:** Cuando el microorganismo es inhibido por las concentraciones alcanzadas por el agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada es usada para el sitio de la infección.
- **Resistencia intermedia:** Cuando el microorganismo presenta una CMI cercana a los niveles del antimicrobiano usualmente alcanzados en sangre o tejidos y para los cuales la respuesta puede ser más baja que para los aislados susceptibles.
- **Resistente:** Cuando el microorganismo no es inhibido por las concentraciones séricas del agente antimicrobiano normalmente alcanzadas a dosis normales.

En la **Tabla 2** se muestran las categorías de interpretación, de acuerdo con los puntos de corte de la CMI, para los antibióticos ampicilina, cefoperazona, ciprofloxacina, colistina y tetraciclina que se deben seguir al evaluar aislados bacterianos que pertenecen a la familia de las enterobacterias.

Tabla 2. Categorías de interpretación basadas en los puntos de corte de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) para determinar la susceptibilidad a los antibióticos ampicilina, cefoperazona, ciprofloxacina, colistina y tetraciclina en bacterias de la familia Enterobacteriaceae por el método de microdilución en caldo (CLSI, 2017).

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Susceptible
Ampicilina	$\geq 32 \mu\text{g/ml}$	$16 \mu\text{g/ml}$	$\leq 8 \mu\text{g/ml}$
Cefoperazona	$\geq 64 \mu\text{g/ml}$	$32 \mu\text{g/ml}$	$\leq 16 \mu\text{g/ml}$
Ciprofloxacina	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$	$2 \mu\text{g/ml}$	$\leq 1 \mu\text{g/ml}$
Colistina	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$	-	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$
Tetraciclina	$\geq 16 \mu\text{g/ml}$	$8 \mu\text{g/ml}$	$\geq 4 \mu\text{g/ml}$

Siguiendo las recomendaciones del CLSI, como control del ensayo se utilizó a la cepa *E. coli* ATCC® (*American Type Culture Collection*) 25922, la cual es susceptible a todos los antibióticos a los cuales se ha probado. El uso de esta cepa como control interno del experimento es indispensable, ya que permite determinar si la preparación y concentración del antibiótico es la correcta. Los puntos de corte de la CMI para la cepa control *E. coli* ATCC® 25922 se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Puntos de corte de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) para la cepa *E. coli* ATCC® 25922 para el método de microdilución en placa (CLSI, 2017).

Antibiótico	<i>E. coli</i> ATCC® 25922
Tetraciclina	$0.5-2 \mu\text{g/ml}$
Ampicilina	$2-8 \mu\text{g/ml}$
Ciprofloxacina	$0.004-0.016 \mu\text{g/ml}$
Cefoperazona	$\leq 0.5/9.5 \mu\text{g/ml}$
Colistina	$0.25 \mu\text{g/ml}$

Solución “stock” de antibióticos (5120 $\mu\text{g/ml}$). Pesar 0.0256 g del antibiótico correspondiente y disolverlo en 5 ml del solvente, filtrar con un filtro de 0.22 μm y repartir la solución en alícuotas de 200 μl , mantener a -20°C hasta su uso. Los 5 antibióticos utilizados (ampicilina, cefoperazona, ciprofloxacina, colistina y tetraciclina) fueron obtenidos de la compañía SIGMA-ALDRICH. Todos los antibióticos fueron disueltos en agua, excepto la ampicilina, que se disuelve en buffer fosfato, pH 8.0.

De acuerdo con los rangos de concentraciones definidos en las Tablas 2 y 3, para obtener las concentraciones a evaluar, diferentes diluciones de cada uno de los antibióticos se prepararon en caldo de cultivo CAMHB (V:V) a partir de la solución “stock” (**Figura 5**).

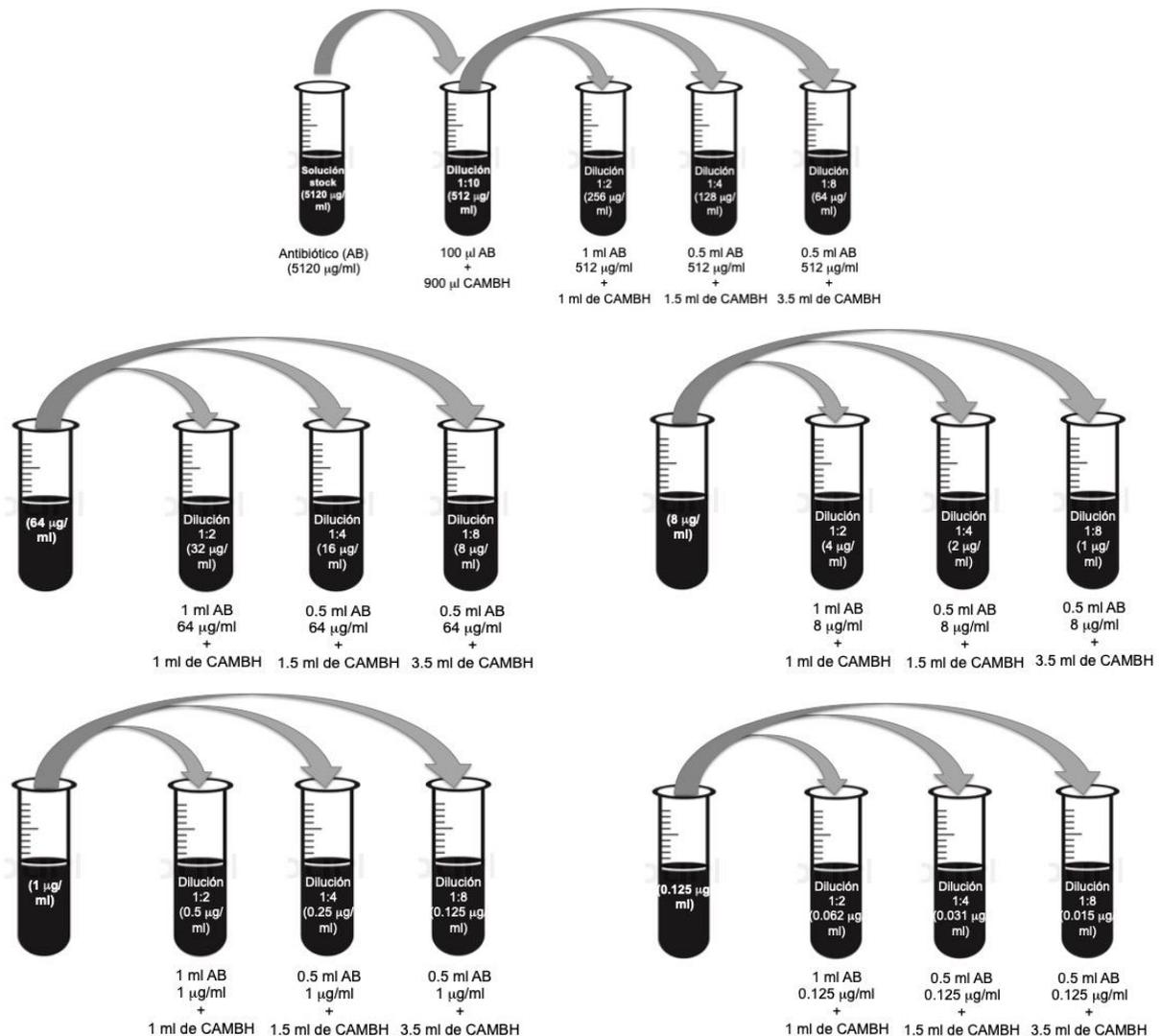


Figura 5. Esquema de preparación de las diluciones de los antibióticos.

Posteriormente, 100 µl de cada una de las diferentes diluciones de los antibióticos se adicionaron en placas estériles de 96 pozos (Corning).

Paralelamente, pre-inóculos de los aislados de *E. coli* incubados en LB a 37°C durante toda la noche fueron re-inoculados en LB fresco hasta obtener una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0.4 ($\sim 1 \times 10^8$ células/ml). Estos cultivos se diluyeron 1:20 en medio MH (V:V) y 10 µl de esta dilución fueron inoculados en cada pozo, para tener una concentración final de $\sim 50,000$ bacterias por pozo. Para cada aislado se incluyó un pozo como control positivo de crecimiento bacteriano, en el cual se inocularon a las bacterias ($\sim 50,000$) en CAMHB sin antibiótico. Como control negativo del ensayo, en cada placa se inocularon pozos con 100 µl de medio CAMHB sin bacterias ni antibiótico. Las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ C$ durante 16 h. Finalmente, se determinó si hubo crecimiento en los pozos y los resultados se interpretaron de acuerdo con lo establecido en la Tabla 2 para clasificar a los aislados en susceptibles, de resistencia intermedia o resistentes a la acción de los antibióticos. Las cepas que fueron resistentes a tres o más familias de antibióticos fueron consideradas multirresistentes (MDR, del inglés *Multi-Drug Resistant*).

6.4 Extracción de plásmidos

Para obtener el perfil de plásmidos se siguió un protocolo de extracción de plásmidos de alto peso molecular estandarizado previamente en nuestro grupo de trabajo (datos no publicados).

Soluciones “stock”

Preparar las siguientes soluciones:

Solución 1: 0.5 M Tris pH 7.8, 0.01 M EDTA, 1% glucosa, 2 mg/ml lisozima.

Solución 2: 0.2 N de NaOH y 1% SDS.

Solución 3: Acetato de amonio 7.5 M, pH7.8.

Procedimiento:

1. Obtener pastillas de células de un cultivo de 5 ml incubado durante toda la noche.
2. Resuspender en 150 μ l de Solución 1, agregar 8 μ l de RNAsa (10 mg/ml) e incubar 5 min a temperatura ambiente.
3. Agregar 300 μ l de Solución 2, incubar 10 min en hielo.
4. Agregar 200 μ l de Solución 3 (debe de estar fría), incubar 40 min en hielo.
5. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm a 4°C.
6. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio.
7. Agregar 700 μ l de isopropanol, incubar 10 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm, temperatura ambiente.
9. Tirar el sobrenadante.
10. Agregar 1 ml de etanol al 70%, agitar.
11. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm, temperatura ambiente.
12. Tirar el sobrenadante y secar durante 5-10 min.
13. Resuspender en 30 μ l de agua.
14. Correr 20 μ l en un gel de agarosa 0.7% en buffer TAE (Tris acetato y EDTA) a 120 V durante 2 h.

6.5 Preparación de células competentes para electroporación

Se preparó un inóculo de la cepa *E. coli* DH5- α en 5 ml de LB y se dejó incubando durante toda la noche a 37°C en agitación constante (200 rpm). Se transfirió 1 ml del inóculo incubado toda la noche a un matraz con 100 ml de LB, el matraz se dejó incubando a 37°C en agitación (200 rpm) hasta obtener una DO_{600nm} de 0.6 (~2 h). Una vez que los cultivos alcanzaron la DO_{600nm} deseada, estos se transfirieron a tubos Nalgene de 50 ml y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 8 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspendió en 40 ml de agua milli Q estéril fría. Los cultivos se centrifugaron nuevamente a 8,000 rpm durante 8 min a 4°C, se tiró el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspendió en 40 ml de glicerol al 10% frío. Los cultivos se centrifugaron de nuevo a 8,000 rpm durante 8 min a 4°C y se desechó el sobrenadante.

Finalmente, la pastilla de bacterias se resuspendió en 400 µl de glicerol al 10% y se repartió en alícuotas de 40 µl en tubos Eppendorf estériles.

6.6 Electroporación

Se mezclaron 40 µl de células electrocompetentes con 15 µl de DNA plasmídico, la mezcla se colocó en una celda de electroporación (BIO-RAD) fría y se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms usando un electroporador “MicroPulser Electroporator” (BIO-RAD). Posteriormente, a la celda se le agregaron 200 µl de medio de cultivo SOC y se mezcló, después se transfirió a un tubo de ensayo con 800 µl de medio SOC y se dejó incubando durante 2 horas a 37°C en agitación (200 rpm). Finalmente, se sembraron 50 µl de los cultivos en cajas Petri con medio agar LB suplementado con los antibióticos correspondientes y las cajas se incubaron a 37°C durante 16 h.

7. RESULTADOS

7.1 Algunas cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio presentan multirresistencia a antibióticos

De la colección de 192 cepas de *E. coli* aisladas a partir de aves de traspatio que fueron previamente obtenidas por el grupo del Dr. Talavera (Talavera-González *et al.*, 2021), en este estudio se evaluaron 40 de estos aislamientos.

Los resultados de la determinación cuantitativa de la resistencia/susceptibilidad a los antibióticos tetraciclina (Tc), ampicilina (Amp), ciprofloxacina (Cip), cefoperazona (Cfp) y colistina (Col) se muestran en la **Tabla 4**. De los 40 aislados en estudio, ocho aislados (A17, A32, A56, J1, J15, J40, L16 y O17) fueron susceptibles a los cinco antibióticos analizados; 10 aislados (A12, A51, A61, A70, A79, A83, A89, O1, O8 y O26) presentaron resistencia a un antibiótico; nueve aislados (A1, A24, A38, A43, L26, O2, O3, O4 y O5) mostraron resistencia a dos antibióticos; y ocho aislados (A2, A68, J24, L1, L2, L3, L4 y L7) presentaron resistencia a tres o cuatro antibióticos (**Tabla 4**). Asimismo, un aislado (A4) presentó resistencia a dos antibióticos y resistencia intermedia a un antibiótico; dos aislados (A3 y J3) presentaron resistencia a un antibiótico y resistencia intermedia a un antibiótico; y dos aislados (J10 y J11) tuvieron resistencia intermedia a un antibiótico (**Tabla 4**).

De acuerdo con los resultados de los perfiles de resistencia/susceptibilidad, las 40 cepas de *E. coli* se clasificaron en fenotipos susceptibles (no presentaron resistencia a ninguno de los cinco antibióticos evaluados), resistentes (presentaron resistencia a uno o dos antibióticos) o MDR (fueron resistentes a tres o más antibióticos). Se determinó que la mayoría de las cepas presentaron un fenotipo resistente (frecuencia de 57.5%; 23/40 cepas), seguido del fenotipo MDR (frecuencia de 22.5%; 9/40 cepas) y con la prevalencia más baja se encontraron cepas que tuvieron un fenotipo susceptible (frecuencia de 20%; 8/40 cepas) (**Figura 6**).

Tabla 4. Perfiles fenotípicos de susceptibilidad/resistencia a los antibióticos tetraciclina, ampicilina, ciprofloxacina, cefoperazona y colistina en 40 aislados de *E. coli* procedentes de aves de traspatio. La cepa *E. coli* ATCC 25922 fue incluida como control.

Cepa	Tetraciclina (Tc)	Ampicilina (Amp)	Ciprofloxacina (Cip)	Cefoperazona (Cfp)	Colistina (Col)
ATCC 25922	S	S	S	S	S
A1	R	R	S	S	S
A2	R	R	S	R	S
A3	R	I	S	S	S
A4	R	I	R	S	S
A12	S	S	R	S	S
A17	S	S	S	S	S
A24	R	R	S	S	S
A32	S	S	S	S	S
A38	R	R	S	S	S
A43	R	R	S	S	S
A51	S	R	S	S	S
A56	S	S	S	S	S
A61	R	S	S	S	S
A68	R	R	R	S	S
A70	R	S	S	S	S
A79	R	S	S	S	S
A83	R	S	S	S	S
A89	R	S	S	S	S
J1	S	S	S	S	S
J3	R	I	S	S	S
J10	S	I	S	S	S
J11	S	I	S	S	S
J15	S	S	S	S	S
J24	R	R	R	R	S
J40	S	S	S	S	S
L1	R	R	R	R	S
L2	R	R	S	R	S
L3	R	R	S	R	S
L4	R	R	R	R	S
L7	R	R	R	S	S
L16	S	S	S	S	S
L26	R	R	S	S	S
O1	R	S	S	S	S
O2	R	R	S	S	S
O3	R	R	S	S	S
O4	R	R	S	S	S
O5	R	R	S	S	S
O8	R	S	S	S	S
O17	S	S	S	S	S
O26	R	S	S	S	S

R=Resistente; I=Resistencia Intermedia; S=Susceptible.

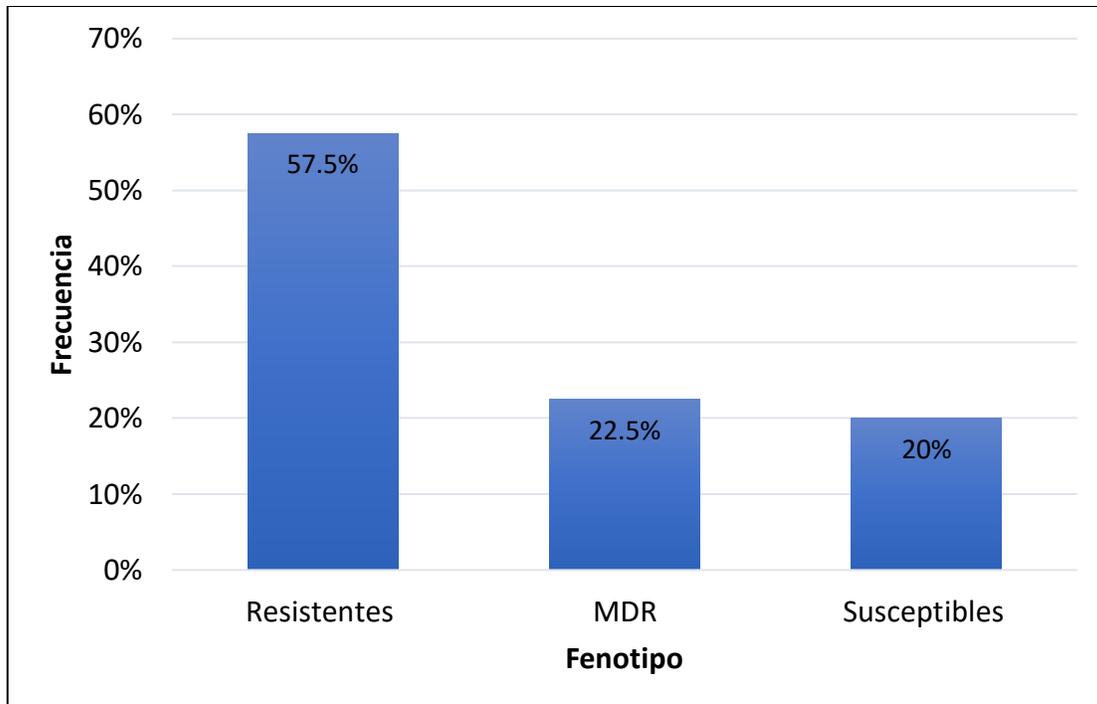


Figura 6.- Frecuencia de fenotipos susceptibles, resistentes o multirresistentes (MDR) a antibióticos de las 40 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio analizadas. Los fenotipos fueron clasificados como sigue: susceptibles, no fueron resistentes a ninguno de los cinco antibióticos evaluados; resistentes, presentaron resistencia a uno o dos antibióticos; multirresistentes, presentaron resistencia a tres o más antibióticos.

Entre los aislados de *E. coli* con fenotipos resistentes y MDR, la resistencia a los antibióticos tetraciclina y ampicilina fue la más frecuente, en porcentajes de 87.5% (28/32 cepas) y 72% (23/32 cepas), respectivamente, mientras que las resistencias a ciprofloxacina y cefoperazona se encontraron en el 22% (7/32 cepas) y 19% (6/32 cepas) de los aislamientos, respectivamente (**Figura 7**); todas las cepas fueron susceptibles a colistina.

Con base en los perfiles de resistencia a antibióticos que presentó cada una de las cepas de *E. coli*, se encontraron siete diferentes patrones de resistencia como resultado de la combinación de los antibióticos a los que fueron resistentes (**Figura 8**). De las 32 cepas con fenotipos resistentes o MDR a antibióticos, la mayoría presentó el patrón de resistencia Tc/Amp (frecuencia de 37.5%; 12/32 cepas), seguido del patrón Tc (frecuencia de 21.9%; 7/32 cepas), mientras que los patrones Amp, Tc/Amp/Cfp, Tc/Amp/Cip y Tc/Amp/Cip/Cfp presentaron la misma prevalencia (frecuencia de 9.4%;

3/32 cepas), sólo una cepa presentó el patrón Cip (frecuencia de 3%; 1/32 cepas) (**Figura 8**).

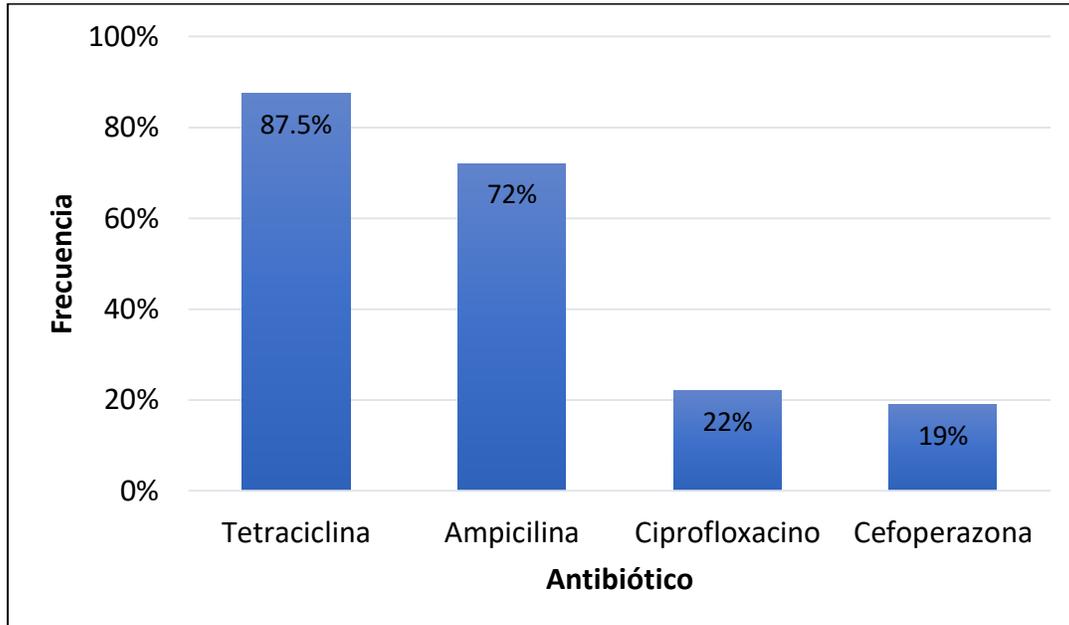


Figura 7.- Frecuencia de la resistencia a los antibióticos ampicilina, cefoperazona, ciprofloxacino y tetraciclina en 32 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio que presentaron fenotipos resistentes y MDR.

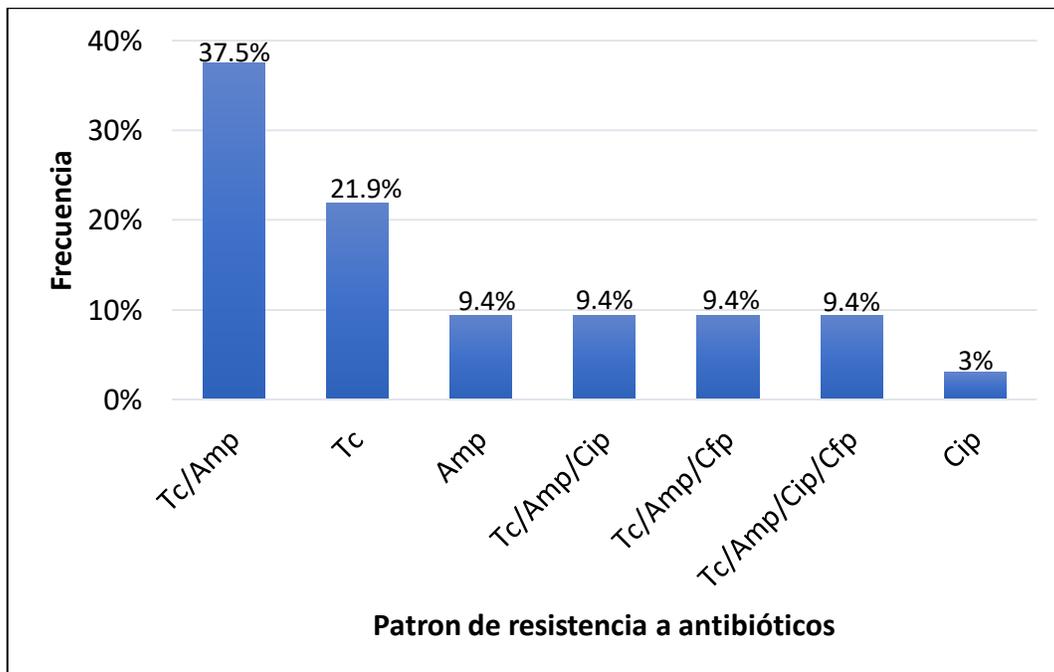


Figura 8.- Frecuencia de los patrones de resistencia a antibióticos encontrados en 32 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio que presentaron fenotipos resistentes y MDR. Amp, ampicilina; Cfp, cefoperazona, Cip, ciprofloxacina; Tc, tetraciclina.

7.2 La prevalencia de las cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio resistentes a antibióticos está asociada con el municipio de colecta

Posteriormente, para definir si la incidencia de cepas resistentes o MDR se distribuía uniformemente o estaba restringida a ciertos municipios, se analizó la prevalencia de los fenotipos susceptibles, resistentes o MDR de las 40 cepas de *E. coli* con relación al municipio del cual fueron aisladas. Como puede observarse en la **Figura 9**, las cepas colectadas a partir de los municipios Atlacomulco, Jocotitlán e Ixtlahuaca presentaron fenotipos resistentes y MDR, mientras que las cepas provenientes de El Oro presentaron fenotipos resistentes, pero no MDR. En los municipios de Ixtlahuaca y El Oro se encontró la mayor prevalencia de cepas con fenotipos MDR (frecuencia de 71.4%; 5/7 cepas) y fenotipos resistentes (frecuencia de 87.5%; 7/8 cepas), respectivamente (**Figura 9**). Jocotitlán fue el municipio donde hubo la mayor ocurrencia de cepas susceptibles (frecuencia de 42.9%; 3/7 cepas) (**Figura 9**).

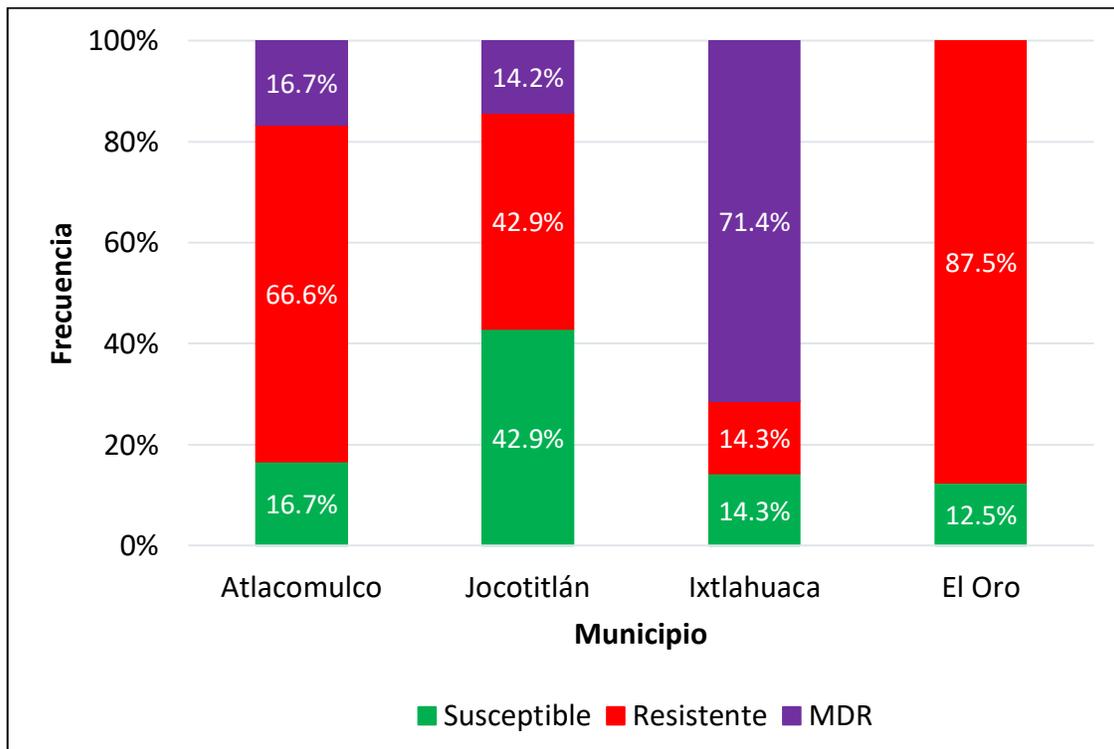


Figura 9.- Frecuencia de fenotipos susceptibles, resistentes o multirresistentes (MDR) a antibióticos de las 40 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio que fueron colectadas a partir de 4 municipios del Estado de México.

7.3 Las cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio son portadoras de plásmidos que le confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina

En *E. coli*, diversos mecanismos de resistencia a antibióticos están codificados en plásmidos, incluyendo la resistencia a tetraciclinas, beta-lactámicos, cefalosporinas y fluoroquinolonas (Poirel *et al.*, 2018), que son algunas de las familias de antibióticos a los que fueron resistentes las cepas de *E. coli* analizadas en este trabajo. Por lo tanto, para comenzar a evaluar si en las cepas en estudio podía haber una asociación entre la resistencia a antibióticos y la presencia de plásmidos, se analizó el perfil de plásmidos de las 40 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio con el fin de determinar si portaban plásmidos de manera natural. Como se observa en la electroforesis en gel de agarosa de la **Figura 10**, todas las cepas de *E. coli* que presentaron un fenotipo de resistencia a antibióticos contienen plásmidos que varían en número (1-9) y velocidades de migración, sugiriendo la posibilidad de que alguno o varios plásmidos confieran resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli*.

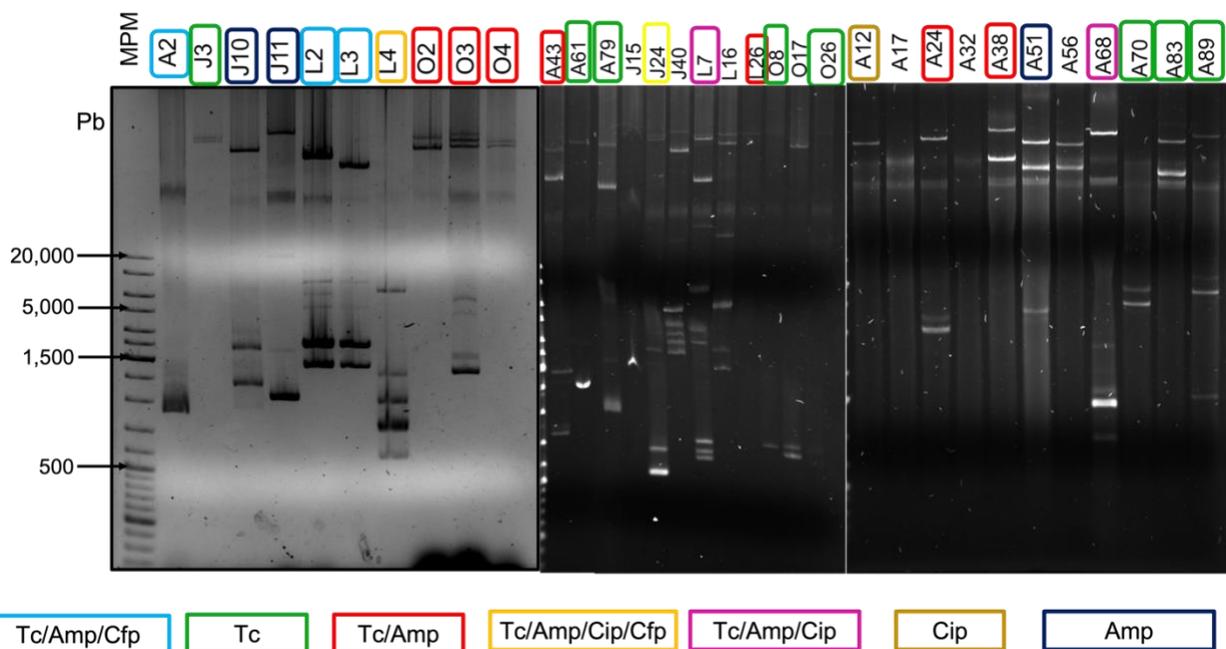


Figura 10.- Perfil de plásmidos de 33 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio. Tras la extracción de los plásmidos, estos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% en Buffer TAE, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. MPM, marcador de peso molecular. Pb, pares de bases. La Figura está compuesta por geles representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. Para cada cepa de donde se extrajeron los plásmidos, se indica su patrón de resistencia a antibióticos.

Para continuar con el análisis de la asociación de la resistencia a antibióticos y la presencia de plásmidos, de las 40 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio se seleccionaron seis (A4, A43, J24, L1, L4 y L7) que presentaron tres distintos patrones de resistencia a antibióticos: Tetraciclina/Ampicilina; Tetraciclina/Ampicilina/Ciprofloxacina; y Tetraciclina/Ampicilina/Ciprofloxacina/Cefoperazona (**Tabla 5**). Dichos patrones representan el 75% del total de los patrones de resistencia (que incluyen más de un antibiótico) que fueron encontrados en las 40 cepas de *E. coli* analizadas en este trabajo (ver **Figura 8**). Las seis cepas de *E. coli* seleccionadas también presentaron cinco distintos perfiles de plásmidos; en estas cepas, los plásmidos que contienen varían en número (2-9) y velocidad de migración, la excepción fueron las cepas L1 y L4, las cuales presentaron un perfil de plásmidos idéntico (**Figura 11**); interesantemente, estas dos cepas también tienen el mismo patrón de resistencia a antibióticos (Tetraciclina/Ampicilina/Ciprofloxacina/Cefoperazona) (**Tabla 5**). En contraste, la cepa J24, aunque también presenta el mismo patrón de resistencia a antibióticos que las cepas L1 y L4, tiene un perfil de plásmidos distinto (**Figura 11 y Tabla 5**).

Tabla 5. Patrón de resistencia a antibióticos de las seis cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio seleccionadas para analizar la asociación entre la presencia de plásmidos y la resistencia a antibióticos.

Cepa de <i>E. coli</i>	Patrón de resistencia a antibióticos
A4	Tetraciclina/Ampicilina/Ciprofloxacina
A43	Tetraciclina/Ampicilina
J24	Tetraciclina/Ampicilina/Ciprofloxacina /Cefoperazona
L1	Tetraciclina/Ampicilina/ Ciprofloxacina /Cefoperazona
L4	Tetraciclina/Ampicilina/Ciprofloxacina /Cefoperazona
L7	Tetraciclina/Ampicilina/Ciprofloxacina

A continuación, se determinó si los plásmidos que naturalmente portan las seis cepas de *E. coli* seleccionadas (las cuales se denominaron cepas parentales), conferían alguna de las respectivas resistencias a antibióticos. Como primer paso, los plásmidos purificados a partir de las cepas parentales fueron transformados mediante electroporación a la cepa

de laboratorio *E. coli* DH5 α . Esta cepa de laboratorio es intrínsecamente resistente únicamente al antibiótico ácido nalidíxico y además no porta ningún plásmido. Por lo tanto, el crecimiento de colonias transformantes de *E. coli* DH5 α en agar LB suplementado con alguno de los antibióticos a los cuales fueron resistentes las cepas parentales (ampicilina, cefoperazona, ciprofloxacina o tetraciclina), indicaría un evento de resistencia adquirida en las colonias de *E. coli* DH5 α como resultado de la integración de uno o más plásmidos procedentes de las cepas parentales. Como control del procedimiento de transformación de plásmidos de alto peso molecular, una alícuota de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α fue transformada con el plásmido pEAF extraído de la cepa *E. coli* EPEC WT, cuyo peso molecular es de aproximadamente 100 Kb (Lacher *et al.*, 2007). Tras las transformaciones, en todas las repeticiones, las colonias transformantes de *E. coli* DH5 α adquirieron resistencia sólo a los antibióticos tetraciclina (Tc^r) o ampicilina (Amp^r), ninguna transformante mostró resistencia adquirida a cefoperazona o ciprofloxacina (**Tabla 6**).

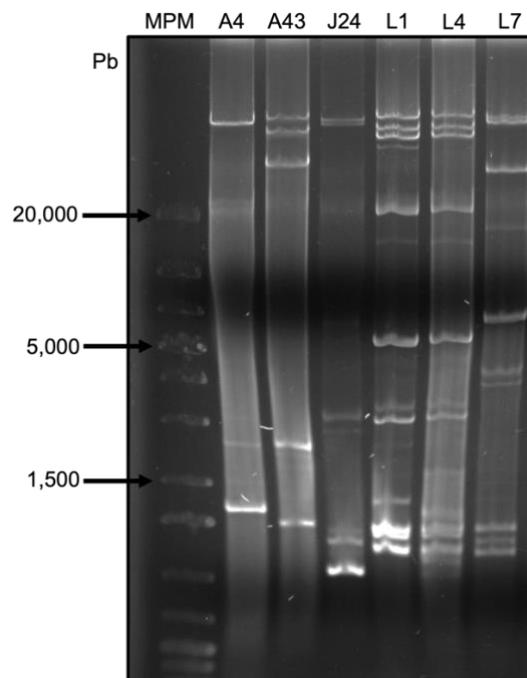


Figura 11.- Perfil de plásmidos de las cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio A4, A43, J24, L1, L4 y L7. Tras la extracción de los plásmidos, estos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% en Buffer TAE, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. MPM, marcador de peso molecular. Pb, pares de bases. Gel representativo de al menos tres experimentos independientes con resultados similares.

Tabla 6. Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos de la cepa *E. coli* DH5 α transformada con plásmidos (p) extraídos a partir de seis cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio (cepas parentales).

Cepa parental	Perfil de resistencia	Cepa transformante	Perfil de resistencia
A4	Tc/Amp/Cip	DH5 α + pA4	Tc
A43	Tc/Amp	DH5 α + pA43	Tc/Amp
J24	Tc/Amp/Cip/Cfp	DH5 α + pJ24	Tc/Amp
L1	Tc/Amp/Cip/Cfp	DH5 α + pL1	Tc/Amp
L4	Tc/Amp/Cip/Cfp	DH5 α + pL4	Tc/Amp
L7	Tc/Amp/Cip	DH5 α + pL7	Tc/Amp

Amp, ampicilina; Cfp, cefoperazona, Cip, ciprofloxacina; Tc, tetraciclina.

Para determinar qué plásmidos podían proporcionar la resistencia a los antibióticos ampicilina o tetraciclina, de las diferentes transformantes de *E. coli* DH5 α obtenidas (Amp^r y Tc^r), se realizaron las respectivas purificaciones de sus plásmidos. Como se observa en la **Figura 12a**, las transformantes de *E. coli* DH5 α recuperadas en presencia de ampicilina (Amp^r) que fueron transformadas con los plásmidos extraídos a partir de las cepas A43, J24 y L7, presentan un único plásmido de alto peso molecular (sus velocidades de migración fueron similares a la del plásmido pEAF, ~100 Kb), mientras que las transformantes electroporadas con plásmidos provenientes de las cepas L1 y L4 también contienen un único plásmido pero de menor peso molecular (sus velocidades de migración son similares a la banda del MPM de 20 Kb), así como otros plásmidos de más bajo peso molecular (DH5 α + pL4). En contraste, la cepa *E. coli* DH5 α sin transformar no presentó ningún plásmido (**Figura 12a**). Estos resultados sugieren que los plásmidos aislados a partir de las transformantes de *E. coli* DH5 α Amp^r son los responsables de conferir resistencia a ampicilina en las cepas A43, J24, L1, L4 y L7. De igual manera, se hicieron purificaciones de plásmidos de las transformantes de *E. coli* DH5 α recuperadas en presencia de tetraciclina (Tc^r) (**Figura 12b**). Las transformantes de *E. coli* DH5 α que fueron transformadas con los plásmidos extraídos a partir de las cepas A4, A43, J24, L1 y L4 contienen un único plásmido de alto peso molecular, mientras que las transformantes electroporadas con los plásmidos provenientes de la cepa L7 presentan 2 plásmidos de alto peso molecular (**Figura 12b**). En contraste, la cepa *E. coli* DH5 α que no fue transformada, no contenía ningún plásmido (**Figura 12b**). Estos resultados sugieren que

los plásmidos aislados a partir de las transformantes de *E. coli* DH5 α Tc^r son los responsables de conferir resistencia a tetraciclina en las cepas A4, A43, J24, L1, L4 y L7.

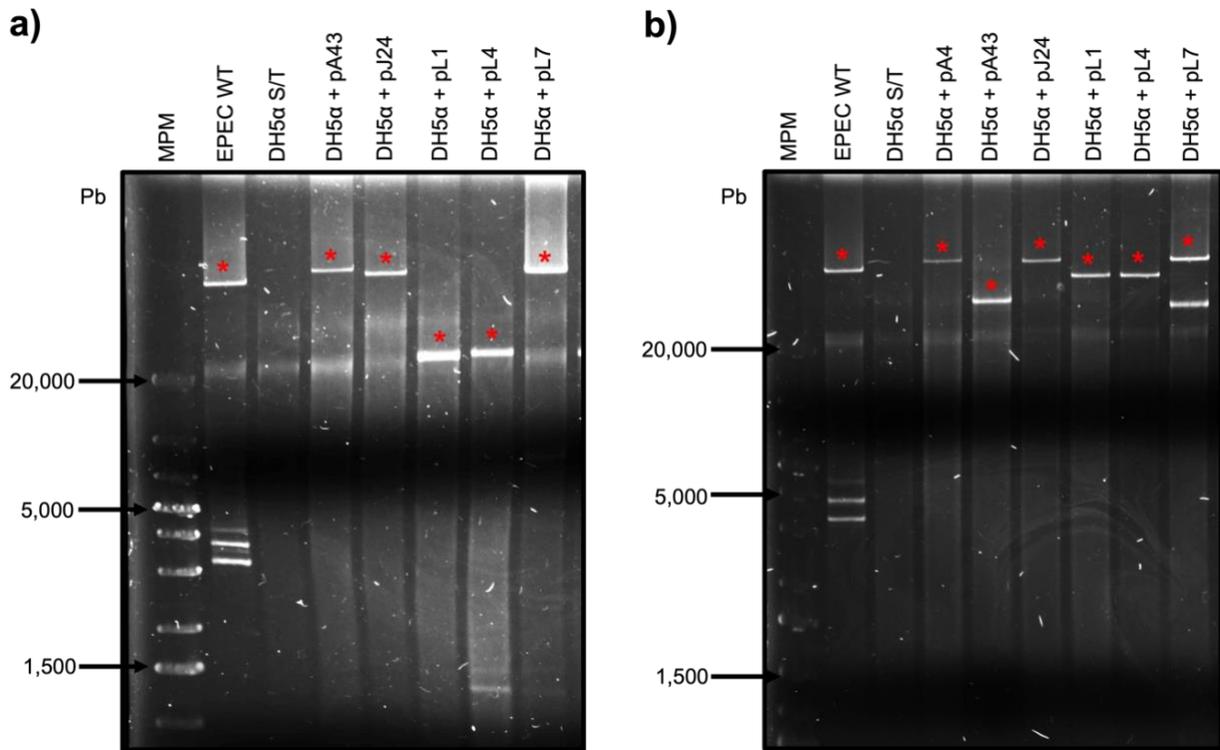


Figura 12.- Plásmidos asociados con la resistencia a ampicilina y tetraciclina purificados de transformantes de *E. coli* DH5 α resistentes a ampicilina o tetraciclina. Se muestran los plásmidos que confieren resistencia a ampicilina **(a)** o tetraciclina **(b)** a las transformantes de la cepa *E. coli* DH5 α que fueron previamente transformadas con plásmidos (p) provenientes de las cepas A4, A43, J24, L1, L4 o L7. Como control del procedimiento de transformación y como referencia de peso molecular, se transformó y posteriormente se purificó al plásmido pEAF extraído de la cepa *E. coli* EPEC WT. Como control negativo se realizó el procedimiento de purificación de plásmidos de la cepa *E. coli* DH5 α sin transformar (DH5 α S/T). Tras la extracción de los plásmidos, estos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% en Buffer TAE, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. MPM, marcador de peso molecular. Pb, pares de bases. La Figura está compuesta por geles representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. Cada plásmido está señalado con un asterisco rojo.

Posteriormente, para corroborar la procedencia de los plásmidos presentes en las transformantes de *E. coli* DH5 α resistentes a ampicilina o tetraciclina, se comparó el perfil de plásmidos de las cepas parentales con el perfil de las colonias transformantes de *E. coli* DH5 α Amp^r y Tc^r para verificar que las velocidades de migración de los plásmidos fueran equivalentes entre ellas. Como se observa en la electroforesis en gel de agarosa de la **Figura 13**, entre cada uno de los plásmidos extraídos a partir de las colonias

transformantes hubo una correspondencia con alguno de los plásmidos que portan las cepas parentales.

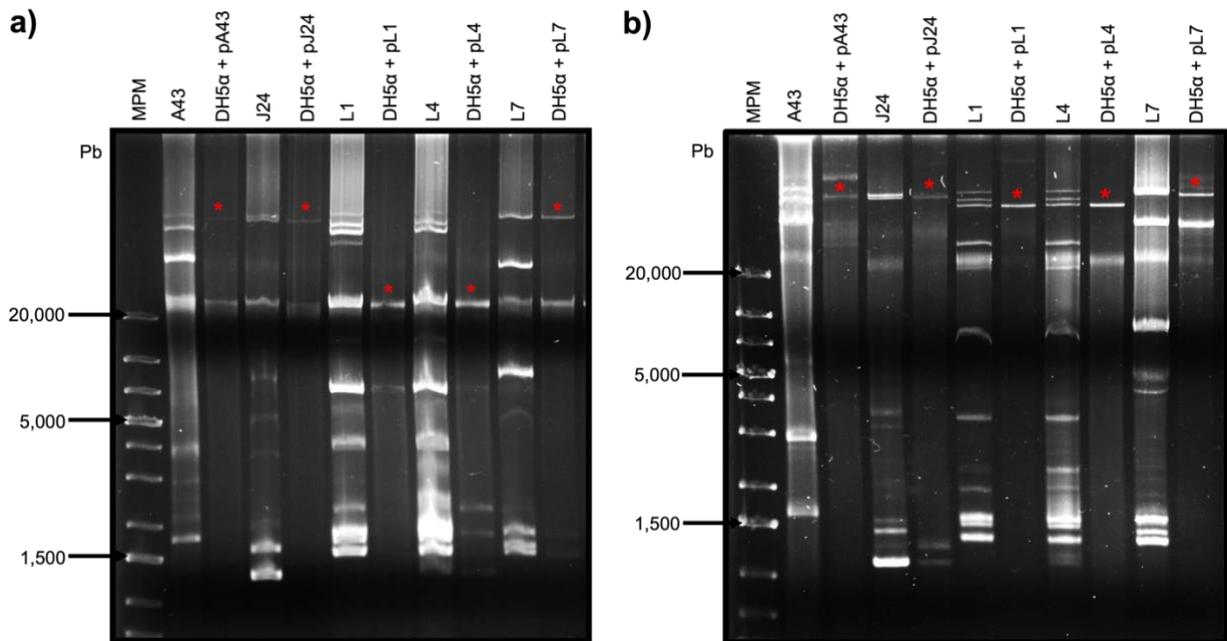


Figura 13.- Comparación de los perfiles de plásmidos entre las cepas parentales y las cepas transformantes. Se muestran los plásmidos purificados a partir de las cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio (A4, A43, J24, L1, L4 o L7) y los plásmidos obtenidos de las cepas transformantes de *E. coli* DH5α resistentes a ampicilina (a) o tetraciclina (b). Tras la extracción de los plásmidos, estos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% en Buffer TAE, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. MPM, marcador de peso molecular. Pb, pares de bases. La Figura está compuesta por geles representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. Cada plásmido está señalado con un asterisco rojo.

Con el fin de determinar si los plásmidos que se encontró que estaban asociados con la resistencia a ampicilina también podían conferir resistencia a tetraciclina y viceversa, las colonias transformantes de *E. coli* DH5α resistentes a ampicilina (Amp^r) fueron crecidas en agar LB suplementado con tetraciclina, mientras que las transformantes de *E. coli* DH5α resistentes a tetraciclina (Tc^r) fueron crecidas en agar LB suplementado con ampicilina. Adicionalmente, el fenotipo de susceptibilidad/resistencia de las transformantes de *E. coli* DH5α a los antibióticos ampicilina y tetraciclina también se determinó cuantitativamente por el método de microdilución en caldo. Como se observa en los resultados de la **Tabla 7**, las transformantes de *E. coli* DH5α Amp^r que contenían plásmidos procedentes de las cepas parentales A43, J24 y L7, también adquirieron

resistencia a tetraciclina, mientras que las transformadas con plásmidos de las cepas L1 y L4 no adquirieron resistencia a tetraciclina. Por otro lado, transformantes de *E. coli* DH5 α Tc^r que integraron plásmidos procedentes de las cepas parentales J24 y L7, también fueron resistentes a ampicilina, mientras que el resto de las transformantes de *E. coli* DH5 α Tc^r no adquirieron resistencia a ampicilina (**Tabla 8**).

Tabla 7. Características fenotípicas y genotípicas de cepas de *E. coli* DH5 α con resistencia adquirida a ampicilina. Se muestra el perfil fenotípico de susceptibilidad/resistencia al antibiótico tetraciclina (Tc) de las transformantes de *E. coli* DH5 α resistentes a ampicilina (Amp^r) transformadas con plásmidos (p) extraídos a partir de 5 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio (A43, J24, L1, L4 y L7). También se indica el número y sus respectivos pesos moleculares de los plásmidos que están presentes en las cepas de *E. coli* DH5 α transformantes.

Transformantes Amp ^r	Fenotipo en Tc	No. plásmidos	Peso molecular (Kb)
DH5 α + pA43	Resistente	2	<154 y ~66
DH5 α + pJ24	Resistente	1	<154
DH5 α + pL1	Susceptible	1	7-38
DH5 α + pL4	Susceptible	1	7-38
DH5 α + pL7	Resistente	1	<154

Tabla 8. Características fenotípicas y genotípicas de cepas de *E. coli* DH5 α con resistencia adquirida a tetraciclina. Se muestra el perfil fenotípico de susceptibilidad/resistencia al antibiótico ampicilina (Amp) de las transformantes de *E. coli* DH5 α resistentes a tetraciclina (Tc^r) transformadas con plásmidos (p) extraídos a partir de 6 cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio (A4, A43, J24, L1, L4 y L7). También se indica el número y sus respectivos pesos moleculares de los plásmidos que están presentes en las cepas de *E. coli* DH5 α transformantes.

Transformantes Tc ^r	Fenotipo en Amp	No. plásmidos	Peso molecular (Kb)
DH5 α + pA4	Susceptible	1	<154
DH5 α + pA43	Susceptible	1	~66
DH5 α + pJ24	Resistente	1	<154
DH5 α + pL1	Susceptible	1	66-154
DH5 α + pL4	Susceptible	1	66-154
DH5 α + pL7	Resistente	2	<154 y ~66

Finalmente, se determinó el peso molecular aproximado de los plásmidos que confieren resistencia a ampicilina y/o tetraciclina en las cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio A4, A43, J24, L1, L4 y L7. Para este experimento, se utilizó como referencia de peso molecular a los plásmidos extraídos de la cepa *E. coli* 50192, ya que se conoce el

peso molecular exacto de los plásmidos que contiene dicha cepa (Girlich *et al.*, 2000). Los perfiles de plásmidos de las transformantes de *E. coli* DH5 α Amp^r revelaron que hay dos plásmidos asociados con la resistencia a ampicilina: uno de un peso molecular de entre 7-38 Kb (derivado de las cepas L1 y L4) y otro de <154 Kb (derivado de la cepa A43) (**Figura 14** y **Tabla 7**). Para el caso de las transformantes de *E. coli* DH5 α Tc^r se encontraron tres plásmidos asociados con la resistencia a tetraciclina: uno de un peso molecular de ~66 Kb (derivado de la cepa A43), otro de entre 66-154 Kb (derivado de las cepas L1 y L4) y uno de <154 Kb (derivado de las cepas A4 y J24) (**Figura 14** y **Tabla 8**). Estos resultados también revelaron que un plásmido de <154 Kb (derivado de las cepas J24 y L7) confiere resistencia a ampicilina y tetraciclina, ya que este plásmido se comparte entre aquellas transformantes que fueron resistentes a ambos antibióticos (**Figura 14**, **Tabla 7** y **Tabla 8**).

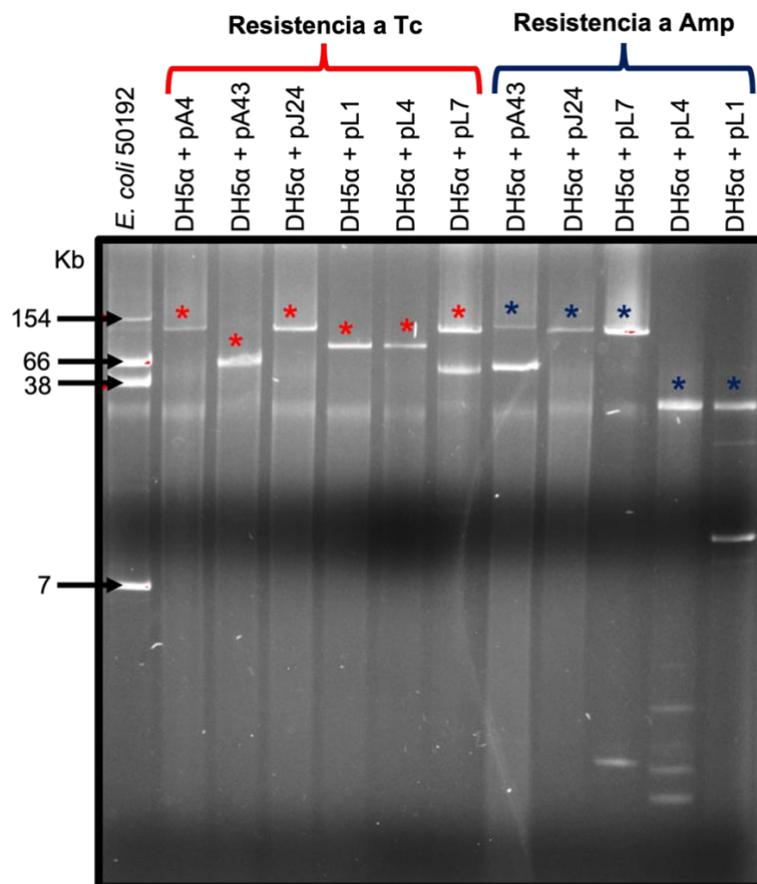


Figura 14.- Peso molecular aproximado. Se realizó la extracción de plásmidos de la cepa DH5 α resistente a tetraciclina y ampicilina transformada con los plásmidos provenientes de las cepas A4, A43, J24, L1, L4 y L7. Los plásmidos se corrieron en un gel de agarosa al 0.7% en Buffer TAE, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. MPM, marcador de peso molecular. Kb, kilobases.

8. DISCUSIÓN

Actualmente, el incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos de uso común es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. La resistencia a antibióticos implica que los fármacos han perdido su actividad tóxica en contra de las bacterias, lo que reduce las opciones terapéuticas para tratar enfermedades provocadas por bacterias resistentes a antibióticos, poniendo en grave riesgo a la salud humana y veterinaria. Las acciones que sean tomadas hoy en día para resolver esta situación determinarán la contención del problema en el futuro.

Con el fin de establecer acciones enfocadas a detener o reducir el problema de la farmacorresistencia, en mayo de 2015 la Asamblea Mundial de la Salud aprobó un Plan de Acción Mundial Sobre la Resistencia a los Antimicrobianos (incluida la resistencia a los antibióticos) (OMS, 2016). Una de las acciones propuestas en dicho plan es establecer programas de vigilancia en animales de consumo, ya que grandes cantidades de antibióticos son administrados en estos animales durante su producción, generando una presión selectiva para la proliferación de bacterias resistentes. Cabe resaltar, que la resistencia a antibióticos no se restringe a cepas patógenas de origen clínico o expuestas a grandes cantidades de antibióticos, sino que también existen bacterias farmacorresistentes no patógenas o comensales que están presentes en entornos no clínicos o ambientes donde no hay fuertes presiones de selección en la ausencia de antibióticos usados masivamente (animales no alimentados con dosis subterapéuticas de antibióticos, medio ambiente, entre otros). Dichas bacterias tienen el potencial de ser adquiridas por los seres humanos a través de múltiples vías, por lo que es importante vigilar su presencia en animales usados para consumo humano que tienen menor probabilidad de ser expuestos directamente a antibióticos, como sería el caso de los animales criados en traspatios. Por lo tanto, la vigilancia de bacterias resistentes a antibióticos tendría que realizarse tanto en aquellos animales que son criados de manera intensiva, donde se administran antibióticos, como en aquellos animales que son criados en traspatios, donde no se administran antibióticos de manera continua.

En el presente proyecto, usando un método cuantitativo se determinó la susceptibilidad a cinco antibióticos (ampicilina, ciprofloxacina, cefoperazona, colistina y tetraciclina) de distintas familias (según su mecanismo de acción), en 40 cepas de *E. coli* que fueron aisladas previamente de la cloaca de aves de traspatio de cuatro municipios del Estado de México: Atlacomulco, Jocotitlán, Ixtlahuaca y el Oro. El 57.5% de las cepas presentaron resistencia a uno o dos antibióticos, mientras que el 22.5% presentó resistencia a más de tres antibióticos, por lo que fueron catalogadas como multirresistentes. La gran mayoría de las cepas fueron resistentes a tetraciclina (87.5%) y ampicilina (72%), mientras que la resistencia a ciprofloxacina y cefoperazona la presentaron el 22% y el 19% de las cepas, respectivamente. Ninguna de las cepas fue resistente a colistina. Al comparar las frecuencias de resistencia a antibióticos encontradas en otros estudios es de notar la diferencia en los resultados, lo cual se puede atribuir a aspectos particulares en el manejo de los antibióticos en la medicina humana y veterinaria en los distintos lugares geográficos y entornos (Talavera-González et al., 2021).

Cabe resaltar que la cefoperazona, ciprofloxacina y colistina están catalogados por la Organización Mundial de la Salud como de importancia crítica para la medicina humana (OMS, 2017). Lo anterior quiere decir que constituyen uno de los pocos o el único tratamiento disponible para tratar infecciones bacterianas graves en humanos y que además son utilizados para tratar infecciones humanas causadas por: 1) bacterias que pueden ser transmitidas a los humanos a partir de fuentes no humanas, o 2) bacterias que pueden adquirir genes de resistencia a partir de fuentes no humanas, por lo que la vigilancia de la resistencia a estos antibióticos es muy importante (AGISAR, 2018). Con base en esto, la OMS busca promover la utilización prudente de estos antibióticos. El fenotipo de resistencia a dos antibióticos de importancia crítica (cefoperazona y ciprofloxacina) presente en las cepas estudiadas aquí, evidencia la falta de control en el uso de estos antibióticos en nuestro país.

Dos razones principales nos llevan a formular la hipótesis que es poco probable que los fenotipos de resistencia y MDR presentados por las cepas de *E. coli* aisladas de aves de

traspatio esté relacionada con la exposición excesiva a antibióticos. La primera es que la alimentación de las aves de traspatio consiste principalmente en lo que las aves pueden recoger como hojas, hierbas tiernas, forrajes, insectos, sobrantes de comida, frutas y tortilla; también se pueden proporcionar granos como maíz, trigo, sorgo o arroz los cuales son utilizados por las familias para su propio consumo (Cuca-García et al., 2018). En general, el sistema de traspatio no se caracteriza por utilizar los piensos para animales que tienen antibióticos adicionados. La segunda razón es que el control sanitario y/o la atención veterinaria es escasa en la avicultura de traspatio (Cuca-García et al., 2018), por lo que es improbable que a dichas aves se les hayan administrado tratamientos con antibióticos. Por todo esto, el ambiente (por ejemplo, el agua) o el contacto cercano con las personas podrían ser la fuente de intercambio de determinantes genéticos asociados con la resistencia a antibióticos que determinaron el fenotipo de resistencia en las cepas de *E. coli* aisladas de aves de traspatio. Consistente con lo anterior, se ha reportado que algunos antibióticos persisten en el medio ambiente, dependiendo de su sorción a partículas orgánicas en el suelo y su transformación o degradación por procesos bióticos o abióticos, lo cual está determinado por las propiedades fisicoquímicas del mismo, factores climáticos o características del suelo (Cycon et al., 2019; Pikkemaat et al., 2016). Se han detectado concentraciones de diversos antibióticos en suelo, estiércol, biosólidos (materia orgánica reciclada a partir del tratamiento de aguas residuales procesadas), agua y cultivos de plantas, siendo algunos de los más abundantes las tetraciclinas (2.68 µg/g en suelo y 184 µg/g en estiércol) y la ciprofloxacina (3.26 µg/g en biosólidos) (Pan and Chu, 2017).

De notar es también el hecho que la mayor prevalencia de cepas MDR se encontró en el municipio de Ixtlahuaca, con una frecuencia de 71.4%. Interesantemente, de los cuatro municipios de donde se aislaron las cepas bacterianas, Ixtlahuaca es el más cercano a la Ciénega Chimaliapan (56 km), la cual está altamente contaminada con aguas residuales y pertenece al sistema de humedales Ciénegas de Lerma ubicado en el Estado de México (Talavera-González et al., 2021). Si este cuerpo de agua representa un ambiente donde existe abundancia de genes de resistencia a antibióticos tendrá que ser determinado.

Como parte de las medidas de prevención y control del surgimiento de la resistencia a antibióticos en bacterias, distintos organismos internacionales han planteado también determinar las causas que ocasionan el surgimiento de las cepas farmacorresistentes, así como el modo de propagación de los determinantes de resistencia a antibióticos (Redondo and Alonso, 2007). Los plásmidos portadores de determinantes genéticos de resistencia que además sean conjugativos o permitan su movilización, son las estructuras extracromosomales de mayor relevancia epidemiológica, ya que promueven la propagación horizontal de genes de resistencia, contribuyendo al aumento de las poblaciones bacterianas farmacorresistentes, así como la aparición de cepas patógenas multirresistentes (Redondo and Alonso, 2007).

En este estudio se determinó la presencia de plásmidos en las cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos aisladas de aves de traspatio como una de las vías de adquisición de los determinantes de resistencia a ampicilina y tetraciclina. Los tamaños de los plásmidos fueron de <38-154 Kb y dos de estos se asociaron con la resistencia a ampicilina, tres con la resistencia a tetraciclina y uno con la resistencia a ambos antibióticos.

Los plásmidos que median la MDR se caracterizan por ser generalmente grandes (>50 kb), autoconjugativos, con bajo número de copias, y codifican la resistencia a todas las clases de antibióticos importantes, incluidos los aminoglucósidos, β -lactámicos, fenicoles, quinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas (Szmolka and Nagy, 2013). Debido a su extrema flexibilidad en la adquisición y transmisión de la gran mayoría de los genes de resistencia, los plásmidos pueden funcionar como un tipo de sistema de alerta en la estimación del estado actual de los determinantes de resistencia (Szmolka and Nagy, 2013).

La presencia de múltiples determinantes de resistencia en plásmidos movilizables, implica una alta probabilidad del surgimiento y selección de cepas multirresistentes a los antimicrobianos en un área determinada, reduciendo así las opciones terapéuticas locales (Redondo and Alonso, 2007).

Este trabajo representa uno de los pocos que se han realizado en nuestro país donde se reporta la prevalencia de cepas comensales de *E. coli* resistentes a antibióticos aisladas de sistemas de traspatio. También se determinó la presencia de diversos plásmidos como los responsables de contener elementos genéticos que confieren resistencia a ampicilina y tetraciclina. Estudios futuros permitirán evaluar el riesgo que la presencia de elementos genéticos móviles asociados con la resistencia a antibióticos en bacterias comensales representan para la salud pública, especialmente en el contexto de las aves de corral de traspatio, donde una frecuencia alta de contacto entre humanos y aves de corral es esperada.

9. CONCLUSIONES

- De las 40 cepas analizadas, el 57.5% de las cepas presentaron un fenotipo resistente a antibióticos, mientras que el 22.5% mostraron multirresistencia.
- El mayor porcentaje de resistencia se detectó frente a la tetraciclina (87.5%) y la ampicilina (72%).
- Ninguna de las cepas evaluadas fue resistente a colistina.
- Se encontraron 7 patrones de resistencia a antibióticos, siendo el más frecuente el patrón de resistencia Tc/Amp (37.5%).
- Hubo una correlación entre el municipio de colecta y el perfil de susceptibilidad/resistencia a antibióticos de las cepas.
- Las diferentes cepas presentan un perfil de plásmidos que varía en número y tamaño de los plásmidos.
- Se encontraron cinco plásmidos de <38-154 Kb asociados con la resistencia a los antibióticos tetraciclina y ampicilina.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar si los plásmidos portadores de la resistencia a los antibióticos tetraciclina y ampicilina son de tipo conjugativos.
- Secuenciar los plásmidos que se determinó que están asociados con la resistencia a los antibióticos tetraciclina y ampicilina y realizar su tipificación molecular.
- Determinar cuáles son los genes cuyos productos confieren resistencia a tetraciclina y ampicilina en los distintos plásmidos encontrados.
- Comparar la secuencia de los plásmidos con bases de datos disponibles y determinar su similitud con plásmidos de *E. coli* comensales aisladas de humanos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- ACS, RCS, 1999. American Chemical Society and Royal Society of Chemistry. The discovery and development of penicillin 1928-1945. Commemorative booklet. (PDF).
- Acuña, L.G., 2002. Descubrimiento de la penicilina: un hito de la medicina, cómo el azar puede ayudar al científico. *Rev Méd Clín Condes* 13, 30-34.
- AGISAR, 2018. Grupo Consultivo de la OMS sobre Vigilancia Integrada de la Resistencia a los Antimicrobianos (AGISAR). Antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana. Sexta revisión, 2018. Organización Mundial de la Salud (PDF).
- Aguilar-Montes de Oca, S., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., Barba-Leon, J., Vazquez-Navarrete, J., 2015. Determination of extended spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. *Trop Anim Health Prod* 47, 975-981.
- Álvarez-Martínez, F.J., Rodríguez, J.C., Borrás-Rocher, F., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., 2021. The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition. *Sci Rep* 11, 588.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2017. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Microbiol Spectr* 5.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M.H., Nisar, M.A., Alvi, R.F., Aslam, M.A., Qamar, M.U., Salamat, M.K.F., Baloch, Z., 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist* 11, 1645-1658.
- Balaban, N.Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D.I., Brynildsen, M.P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J.J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J.M., Hardt, W.D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D.T., Jenal, U., Levin, B.R., Michiels, J., Storz, G., Tan, M.W., Tenson, T., Van Melderen, L., Zinkernagel, A., 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol* 17, 441-448.
- Barber, M., Rozwadowska-Dowzenko, M., 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *The Lancet* October 23, 641-644.
- Belloso, W.H., 2009. Historia de los antibióticos. *Rev Hosp Ital B Aires* 29, 102-111.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2018. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 42.
- Bennett, P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S347-357.
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42-51.
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8, 1137-1144.
- Cabrera, C.E., Gómez, R.F., Zúñiga, A.E., 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* 38, 149-158.
- Camacho Rábago, O., Acedo Ruíz, L.E., Moreno Ibarra, G.M., Sánchez Maríñez, R.I., Castellón Campaña, L.G., Navarro Navarro, M., 2010. Detección de *Salmonella* resistente a los antibióticos en vísceras de pollo. *BIOTecnia* XII, 3-11.

- Cantón, R., 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 1, 20-25.
- Cassini, A., Hogberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D.A., Oliveira, T.C., Struelens, M.J., Suetens, C., Monnet, D.L., Burden of, A.M.R.C.G., 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 19, 56-66.
- CDC, 2013. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. (PDF).
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555-4558.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep* 5, 58-65.
- CLSI, 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Edition. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Wayne, Pennsylvania, USA. (PDF).
- Cox, G., Wright, G.D., 2013. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 303, 287-292.
- Cuca-García, J., Gutiérrez-Arenas, D.A., Lòpez-Pèrez, E., 2018. La avicultura de traspatio en México: historia y caracterización. *Agro Productividad* 8, 30-36.
- Cycon, M., Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., 2019. Antibiotics in the Soil Environment-Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Front Microbiol* 10, 338.
- Del Rio-Avila, C., Rosario, C., Arroyo-Escalante, S., Carrillo-Casas, E.M., Diaz-Aparicio, E., Suarez-Guemes, F., Silva-Sanchez, J., Xicohtencatl-Cortes, J., Maravilla, P., Hernandez-Castro, R., 2016. Characterisation of quinolone-resistant *Escherichia coli* of 1997 and 2005 isolates from poultry in Mexico. *Br Poult Sci* 57, 494-500.
- ECDC, 2012. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012. Stockholm: ECDC, 2014.
- EFSA, ECDC, 2017. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA J* 15, e04694.
- EFSA, ECDC, 2019. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food. *EFSA J* 17, e05709.
- Fernández Ferrán, R., Rodríguez Pérez, C., Rodríguez Ribalta, I., Gómez Martínez, F., 2003. *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. *Revista Cubana de Pediatría* 75.
- Fernández-Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L.M., Machado Betarte, C., 2003. Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit* 32, 44-48.
- Fleming, A., 1945. Alexander Fleming. Penicillin. Nobel Lecture. December 11, 1945. PDF, 83-93.

- Fleming-Dutra, K.E., Hersh, A.L., Shapiro, D.J., Bartoces, M., Enns, E.A., File, T.M., Jr., Finkelstein, J.A., Gerber, J.S., Hyun, D.Y., Linder, J.A., Lynfield, R., Margolis, D.J., May, L.S., Merenstein, D., Metlay, J.P., Newland, J.G., Piccirillo, J.F., Roberts, R.M., Sanchez, G.V., Suda, K.J., Thomas, A., Woo, T.M., Zetts, R.M., Hicks, L.A., 2016. Prevalence of Inappropriate Antibiotic Prescriptions Among US Ambulatory Care Visits, 2010-2011. *JAMA* 315, 1864-1873.
- Forsberg, K., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O.A., Dantas, G., 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337, 1107-1111.
- Fridkin, S., Baggs, J., Fagan, R., Magill, S., Pollack, L.A., Malpiedi, P., Slayton, R., Khader, K., Rubin, M.A., Jones, M., Samore, M.H., Dumyati, G., Dodds-Ashley, E., Meek, J., Yousey-Hindes, K., Jernigan, J., Shehab, N., Herrera, R., McDonald, C.L., Schneider, A., Srinivasan, A., Centers for Disease, C., Prevention, 2014. Vital signs: improving antibiotic use among hospitalized patients. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 63, 194-200.
- Girlich, D., Karim, A., Spicq, C., Nordmann, P., 2000. Plasmid-mediated cephalosporinase ACC-1 in clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 893-895.
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., Elseviers, M., 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet* 365, 579-587.
- Guabiraba, R., Schouler, C., 2015. Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol Lett* 362, fmv118.
- Guardabassi, L., Prescott, J.F., 2015. Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 45, 361-376, vii.
- Gutiérrez-Triay, M.A., Segura-Correa, J.C., López-Burgos, L., Santos-Flores, J., Santos, R.H., Sarmiento-Franco, L., Carvajal-Hernández, M., Molina-Canul, G., 2007. Características de la avicultura de traspatio de Tetiz, Yucatán, México. *Tropical and subtropical agroecosystems* 7, 217-224.
- Hecker, M.T., Aron, D.C., Patel, N.P., Lehmann, M.K., Donskey, C.J., 2003. Unnecessary use of antimicrobials in hospitalized patients. *Arch Intern Med* 163, 972-978.
- Heijnen, L., Medema, G., 2006. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J Water Health* 4, 487-498.
- Heuer, O.E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., Angulo, F.J., 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis* 49, 1248-1253.
- Hollis, A., Ahmed, Z., 2013. Preserving antibiotics, rationally. *N Engl J Med* 369, 2474-2476.
- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., Piddock, L.J.V., 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 387, 176-187.
- INSP, 2010. Regulación y promoción para el uso adecuado de antibióticos en México. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Jaramillo-Villanueva, J.L., Morales-Jiménez, J., Domínguez-Torres, V., 2017. Importancia económica del traspatio y su relación con la seguridad alimentaria en comunidades de alta marginación en Puebla, México. *Agro Productividad* 10, 27-32.
- Jiménez Mejía, R., Gudiño Sosa, L.F., Aguilar López, J.A., Loeza Lara, P.D., 2017. Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. *Rev Mex Cienc Pec* 8.

- Lacher, D.W., Steinsland, H., Blank, T.E., Donnenberg, M.S., Whittam, T.S., 2007. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J Bacteriol* 189, 342-350.
- Lastra, I.J., Muciño, L., Villamar, L., Barrera, M.A., Guzmán, H., Flores, J.L., Maldonado, C., Gómez, M., 1998. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México 1990-1997. Secretaría de agricultura, ganadería y desarrollo social., 47 pp.
- Li, J., Cao, J., Zhu, Y.G., Chen, Q.L., Shen, F., Wu, Y., Xu, S., Fan, H., Da, G., Huang, R.J., Wang, J., de Jesus, A.L., Morawska, L., Chan, C.K., Peccia, J., Yao, M., 2018. Global Survey of Antibiotic Resistance Genes in Air. *Environ Sci Technol* 52, 10975-10984.
- López-Vázquez, M., Martínez-Castañeda, J.S., Talavera-Rojas, M., Valdez-Alarcón, J., Velázquez-Ordóñez, V., 2015. Detección de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar, México. *Arch Med Vet* 47, 245-249.
- Luyt, C.-E., Bréchet, N., Trouillet, J.-L., Chastre, J., 2014. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit care* 18.
- Madec, J.Y., Haenni, M., 2018. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. *Plasmid* 99, 72-81.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18, 268-281.
- Marston, H.D., Dixon, D.M., Knisely, J.M., Palmore, T.N., Fauci, A.S., 2016. Antimicrobial Resistance. *JAMA* 316, 1193-1204.
- Martínez, J.L., 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* 276, 2521-2530.
- Mathew, A.G., Cissell, R., Liamthong, S., 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog Dis* 4, 115-133.
- McEwen, S.A., Fedorka-Cray, P.J., 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis* 34 Suppl 3, S93-S106.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., Jones, A.L., 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 40, 443-465.
- Molina Martínez, P., 2013. Comparación de dos sistemas de producción y de manejo sanitario de las aves criollas de traspatio en los municipios de Ignacio de la Llave y Teocelo, Veracruz. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, Veracruz, México, 47 pp.
- Nayarit-Ballesteros, N., Rubio-Lozano, M.S., Delgado-Suárez, E., Méndez-Medina, D., Braña-Varela, D., Rodas-Suárez, O., 2016. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud Pública de México*, 371-377.
- Nnadozie, C.F., Odume, O.N., 2019. Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environ Pollut* 254, 113067.
- O'Neill, J., 2014. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The Review on Antimicrobial Resistance*. (PDF).

- O'Neill, J., 2015a. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. The Review on Antimicrobial Resistance. (PDF).
- O'Neill, J., 2015b. Rapid diagnostics: stopping unnecessary use of antibiotics. The Review on Antimicrobial Resistance. (PDF).
- Ohl, C.A., Luther, V.P., 2011. Antimicrobial stewardship for inpatient facilities. *J Hosp Med* 6 Suppl 1, S4-15.
- OMS 2016. Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud ((PDF)).
- Pan, M., Chu, L.M., 2017. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Sci Total Environ* 599-600, 500-512.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 31.
- Pérez Morales, D., Bustamante Santillán, V.H., 2018. Crisis mundial por bacterias patógenas resistentes a antibióticos. Si no hay acciones hoy, no habrá cura mañana. *Biotechnología en Movimiento*, 3-5.
- Pérez-Cano, H.J., Robles-Contreras, A., 2013. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica* 4, 187-191.
- Pikkemaat, M.G., Yassin, H., J., v.d.F.-K.H., Berendsen, B.J.A., 2016. Antibiotic residues and resistance in the environment. RIKILT Wageningen UR report 2016.009, 32 pp.
- Poirel, L., Madec, J.Y., Lupo, A., Schink, A.K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S., 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 6.
- Quintana López, J.A., 2018. Introducción a la zootecnia del pollo y la gallina (Prólogo). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Página 12.
- Rantala, M., Holso, K., Lillas, A., Huovinen, P., Kaartinen, L., 2004. Survey of condition-based prescribing of antimicrobial drugs for dogs at a veterinary teachig hospital. *Vet Rec* 155, 259-262.
- Redondo, C., Alonso, G., 2007. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Rev Soc Venezol Microbiol* 27, 100-107.
- Reyes-Rodriguez, N.E., Talavera-Rojas, M., Varela-Guerrero, J.A., Barba-Leon, J., Gutiérrez-Castillo, A.C., Alonso-Fresán, U., 2013. Prevalencia y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* O157:H7 aislada de canales de bovinos sacrificados en rastros del altiplano central Mexicano. *Rev Mex Cienc Pecu* 4, 235-242.
- Rodriguez-Angeles, G., 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* 44, 464-475.
- Roope, L.S.J., Smith, R.D., Pouwels, K.B., Buchanan, J., Abel, L., Eibich, P., Butler, C.C., Tan, P.S., Walker, A.S., Robotham, J.V., Wordsworth, S., 2019. The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute. *Science* 364.
- Shah, D.H., Board, M.M., Crespo, R., Guard, J., Paul, N.C., Faux, C., 2020. The occurrence of *Salmonella*, extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and carbapenem resistant non-fermenting Gram-negative bacteria in a backyard poultry flock environment. *Zoonoses Public Health* 67, 742-753.
- Spengler, G., Kincses, A., Gajdacs, M., Amaral, L., 2017. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules* 22.
- Stockwell, V.O., Duffy, B., 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev sci tech Off int Epiz* 31, 199-210.

- Suda, K.J., Hicks, L.A., Roberts, R.M., Hunkler, R.J., Danziger, L.H., 2013. A national evaluation of antibiotic expenditures by healthcare setting in the United States, 2009. *J Antimicrob Chemother* 68, 715-718.
- Szmlka, A., Nagy, B., 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol* 4, 258.
- Talavera-González, J.M., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., Vazquez-Navarrete, J., Salgado-Miranda, C., 2021. In vitro transduction of antimicrobial resistance genes into *Escherichia coli* isolates from backyard poultry in Mexico. *Can J Microbiol* 67, 415-425.
- Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, M.E., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 983-989.
- Torres, C., Zarazaga, M., 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales, ¿vamos por el buen camino? *Gac Sanit* 16, 109-112.
- Torres-Manrique, C., 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. *Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza*, 1-47.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., Laxminarayan, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5649-5654.
- Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R., 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 742-750.
- Varela-Guerrero, J.A., Talavera-Rojas, M., Gutierrez-Castillo Adel, C., Reyes-Rodriguez, N.E., Vazquez-Guadarrama, J., 2013. Phenotypic-genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Trop Anim Health Prod* 45, 995-1000.
- Varela-Ortiz, D.F., Barboza-Corona, J.E., Gonzalez-Marrero, J., Leon-Galvan, M.F., Valencia-Posadas, M., Lechuga-Arana, A.A., Sanchez-Felipe, C.G., Ledezma-Garcia, F., Gutierrez-Chavez, A.J., 2018. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. *Vet Res Commun* 42, 243-250.
- Ventola, C.L., 2015. The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and Threats. *P & T* 40, 277-283.
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L.P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L.A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., Balloux, F., 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun* 9, 1179.
- WEF, 2013. World Economic Forum. Global Risks 2013, Eighth Edition. (PDF).
- Weiman, S., 2016. Antibiotic resistance spreads through diverse species and habitats, part I. *Microbe* 11, 201-207.
- Witte, W., 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int J Antimicrob Agents* 16, S19-S24.
- Woolhouse, M.E.J., Ward, M.J., 2013. Sources of antimicrobial resistance. *Science* 341, 1460-1461.
- Wright, G.D., 2016. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends Microbiol* 24, 862-871.
- Xiong, W., Sun, Y., Zeng, Z., 2018. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environ Sci Pollut Res Int* 25, 18377-18384.

Zaidi, M.B., McDermott, P.F., Campos, F.D., Chim, R., Leon, M., Vazquez, G., Figueroa, G., Lopez, E., Contreras, J., Estrada-Garcia, T., 2012. Antimicrobial-resistant *Campylobacter* in the food chain in Mexico. *Foodborne Pathog Dis* 9, 841-847.

Cuernavaca, Morelos a 19 de enero de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Monica Bobadilla Morales**, con el título del trabajo: **Resistencia a antibióticos asociada a plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves de traspatio de cuatro municipios del Estado de México.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por **Tesis**, como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. VERONICA OBREGÓN BARBOZA

SECRETARIO: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO

VOCAL: DRA. DEYANIRA PÉREZ MORALES

SUPLENTE: DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS

SUPLENTE: DR. MARTÍN TALAVERA ROJAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2021-01-20 20:39:02 | Firmante

utUA3LjQq6nkZT1INWgab4fsj4KKbpVchkKwKsrC2K8duqhi2avQRh6IK+3VeacSkohsqzQ20v6XI+GWRX4dzupmaQDMHoGksYY25LUyPEJ90yPkQliYeYkJlaWXf7FBLCSyV4rZ
YGjVg5KMYyrB+FE5nDFH9FbNjpw8uu4gS6rhv0GMjKZNXLDL1L15+I/DTd/6m3bDlf2ciggYoNRNj8jHsfFwLSXmKjJpypsafpiQbtUQ4SP+vZAcM9RysGDsN212LHclLoVZjJuZ9e/
hYk7H5htrzuLdi5qS4ffvPqzwwqFyF8zHHH2MhbtU11tvvMXr3Yhdm/dYh/jEBJD8+A==

LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO | Fecha:2021-01-21 11:39:59 | Firmante

AXjwWUy6Ghho/RGPVXXLNqZp/tFr518VXHsAK2ZSgwrk42PCFKF+wwfp8CSIED+HP5lbnOXerNwXKqo6UQOGCtpKfIrcQvv4Z5EkBNBHa69/wkKVuaZFQ2pm+YAOKNkY2wk
X9Bn/LRGiU+brCe1mqenDY7PwLRZkJhdjapaSXwzbZT4XIAGsRGTTruCGp2+oKVVW+UsJvuPbnaDBPoP/QotwgbkykzI85c5O5ZGotUu5Cn70AXN97iMjFgcdHT3BeLoKkZIM/
un9Gbe4CFC711MUY11U0pVnm0XvjBN3SnOL9P3EPIUejQNwNXB75B7TsV6j8yAj0/6U8TQ3A==

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2021-01-21 12:49:06 | Firmante

cBi3eISxuZiBlzhcA+XsyrkW/aAXrIGCCUozjFZ3CjUE4Hb7jsycBI3pexE/PXpdS2acSdd5QnKvJJHoDyxtk3QqDn43SjcD81hJc607ErS5NnPLYToWYwE4IKgw4oUHMPslatgnKvE/i
v5FTJ/zlflA2RWYyC0FLSrBV4T/VDTYkE93rdjiicPiJzxIWm2Nitt1UE7Yt6dn5CjEE1htZc6s3InFGQE3yyCYxvbxenUTiYqm9K4YcFmafBR4IHmyaYhVPu20H3cksmGYEBZTzPUW
RLvdq7m9j4gKlaqwoiogviTubajSAITwuci5W610kBeK3fVhvrftkLQE3WeQ==

DEYANIRA PÉREZ MORALES | Fecha:2021-01-29 11:56:57 | Firmante

brUWxhtM6VgtV8Iv7Qpw+IS51kGgUrmwxc3tCW5qJe5M5verQxM1pHjSeX8IqCEAcJJ8Zpq1f3dYLMFlm/95luwпкиFN5/UFQApZ5FRu3uuqwcsvyr1+90+Dpvq2SJsRS7H6I6uViS
TZWJgkhwdc9UfNfs4I+ZrAT9jRMAZGvmZLiAPe7rpEZvpRI06TApUAO7OoGSo0OceC/MGEGDJ9iacf2ylZFahMmDcejxUO1A0K7bVZLZLQDb+C7SC9HalEy3SUq4BDfK9nDP
WYtriJGzDIDdUQP4xfY28sr//zFaLGV4WtUI7+DSbwor1slLu0m/cLxfN6feQfukP6cbjA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



4Tabt3

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TThSo9Pbjh4C2ckkMSXzbyGEYN6TLdw>

