

Cuernavaca, Morelos a 20 de octubre 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 la Pasante de Biólogo: **DANIELA MARTÍNEZ TORRES**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE HUMANOS Y CERDOS.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el voto de calidad y pueda optar por la Modalidad de Titulación Profesional por Etapas como lo marca el artículo 33° 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. MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

SECRETARIO: M. EN B. LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO

VOCAL: DRA. ELSA MARIA TAMAYO LEGORRETA

SUPLENTE: M. EN C. MARIA LUISA BARROSO GARCIA

SUPLENTE: DRA. CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA



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

LUIS ENRIQUE CRUZ TRUJILLO | Fecha:2021-10-22 10:26:08 | Firmante
VZKQd+pvJc+8qyTsiNjYQZnHyABDRcrXp2qosXTEvyGg3M9bJ2BWHLg0NV91pLbfr+R8xJzzwRHsSVag2TRTI2PCr9vbuUmPLA98S8HeZYZnXT/XT1YWAhQncTUcHz
4qAGwFC12pyrtp0FUk7oyfntGFhu-888#LlbyjbmniWcd9/eJnGq9ry2M6F2yA+teLuDCOOXp806P+C2uoV7jDrmvGIIIDSwRetH+9eTEag79gyVFFRrJfMxAdw3GjyeDws8hNp
3RkmlJkQ3onYMMB33fvp2AES1WOZ1g7C33KvEMChH24u71h6uQqE4O4ku6QDmQ==

MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2021-11-04 14:68:00 | Firmante
nG+UAERjYVdQjDgQcKtOBngbubRNrymX1mESsAXa41JDWSrUyA3Rl/qzospX07Rzaezel15GxYagBpZy/Y8TVYCSZvH76OqhmV0FH5x0I3NAIZXbwn6Hb5GoTuDbGzvrPEL
OFU4eAN/d4Wvq3ekHHPMaCWpZ8czeNpdB86aJ8y5K58bN15Vh6FoBZSLCDUfPM+GAYrQazmSlsrQHIAvWbnURsXX3BeKbRjWBD8k10GRcXDNIMNjNh8yVVerC2bDy2
8d36jppFR5Bn849GaGowj1Yy7uUTEDo1mcASTE0aXaGVTCKQnPIYYIDmSz4Bzm8rHossFI0oo7GQ==

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2021-11-11 14:31:20 | Firmante
SmE8zT7JXpx8FLYwa8vOT8VH0sjeQMCAZUXcI6Z87JeJUIISwXVEFjge8wZTTNaV4hRL/E8crYvX0Kv0XZ/H8uJQc01ZBPzjG8u7e77bOoAbQNhQImBqR7qhN0EjC9ILG
xW4FgFxbvncIRler6LLb3xukYW0IkQgVORsSA90sNPIHBucaepXUvSnMYPhmY4x7SVKwT1UJQRE4u7hK0gujh9ZDkt11votWln1CuAU1X9QJEJ2DqA4oV1x031gnXCV9m8x8Kz
NwJb1zEwusC3HEIXXt6T9tQbFwUMEmgO7eUd4SCINIdqV7Hmv9v+0BeXU2HLI3IefOQ==

ELSA MARIA TAMAYO LEGORRETA | Fecha:2021-11-18 11:32:44 | Firmante
aGSo0pq7PauyheaguckjyLz8WMT6im789AUR6ZLCSAAtmgH4oIGPQgTb1r3+zza7z9oSc1EDkdVasID5Nye7Dx6Igd9EYVBBh4ddVWYJ23G4ZLIE9nHTE3UM77+7H63FFKx
ENIEBz8OI1qnc2UARm3+1H3SPky6c8OnqVNY9pIEEn2dfnV17bZspTDwPamJEFwRyFW9PP1NETscVz9CGafmSblFQa8ncLUMnA7RFYUnMpsu0L78E7WImzOJoQ+FdxL
PoFAbK3nzLVH5YwnhtZJ2E2A6oDf2v6AoY0wLXuNpoHVD80Fm2F7F5srSpQTA8HlvqREBtA==

CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA | Fecha:2021-11-18 13:04:28 | Firmante
YDHB008ngDcaUYunbMktH+++mayLMrGE6xm6kiauL9bn0OsAHJnGWu85a2zQVESfPKP0nPTq7PCzoI3R4Xpo5Y96AMHU9QsdUqsm75UIUqBSOLxthNeKLYHyeYz7GLC
OyIAxUmjn40XWbUaObRwo61MHqCvq3TeoGxN7ceQc6amFYdJCy6aCBuyWVBBWz3j5mrjNyCZ1jg0cv53hU4CKZWJb0tpq9I8GY6ImRrVYqsBC1QimFMBwq5hhAMUR
QjyTgRlBX1pmvYngNY26GZWXGq4pEYggsi1jaavpU1JKPvkjNc4RmzFRkEvECXMC4dqkHMLKcQ==

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



36Q2o8Ez0

<https://efirma.uaem.mx/hoRepublica/656HppR/9jsPlrY7SoMPCXGRSum7WzJ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos y cerdos

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

DANIELA MARTINEZ TORRES

DIRECTORA

DRA. ELSA MARIA TAMAYO LEGORRETA

ASESORA

DRA. CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA



CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE, 2021

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi

DEDICATORIAS

A MI MADRE

REYNA TORRES

Con todo mi amor.

Por ser mi mayor motivación para cumplir mis propósitos, por tu esfuerzo diario y toda la confianza, más el amor incondicional. Sin ti nada de esto sería posible, infinitas gracias mamá.

Te amo.

A MI FAMILIA

A cada uno de mis hermanos por creer en mí. Por estar siempre presentes y hacerme saber que están ahí apoyándome de mil formas, por acompañarme a lo largo de esta etapa tan importante en mi vida.

También a mis sobrinos por hacer mi vida más feliz, por las risas y todos los momentos que compartimos.

Sin duda tengo a la mejor familia que dios me pudo poner en esta vida. A todos, gracias. Les amo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Elsa Maria Tamayo Legorreta, por haber confiado en mí y haberme apoyado en la elaboración de esta tesis. Sin su apoyo y sus consejos este trabajo no habría podido hacerse realidad. Gracias por compartir conmigo sus valiosos conocimientos.

Igualmente, a la Dra. Celia Mercedes Alpuche Aranda, por abrir las puertas del laboratorio para mí y por guiarnos como estudiantes en el mundo de la investigación.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Alejandro, Jackeline y Dara; gracias por su valiosa colaboración en la realización de mi proyecto, además de sus enseñanzas y momentos compartidos llenos de risas y valiosos momentos.

A mis amigas en la facultad, por la compañía, el trabajo juntas y por hacerme ver el lado divertido de la carrera; a Kristal, Fernanda, Dalia, Brenda, Vianey, Cinthya, Claudia, Kenia y Paola, gracias por hacer más fácil la vida universitaria.

También agradezco a Leonardo, por ser mi compañero en toda esta trayectoria, y siempre motivarme a continuar, por escucharme y siempre confiar en que lo lograría. Por tu amor y toda la confianza, gracias.

Al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico a través de la convocatoria Proyectos de desarrollo científico para la atención a problemas nacionales (PDCAPN-2013), con número de proyecto 215146 denominado "Enterobacterias resistentes a Antibióticos, en la interface Salud Animal-Humana-Ecosistemas".

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	III
INDICE DE TABLAS	IV
INTRODUCCIÓN	1
1 MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 ANTIBIÓTICOS.....	3
1.2 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS	4
1.2.1 Cefalosporinas.....	5
1.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	6
1.3.1 Resistencia en la interfase salud humana–animal	6
1.3.2 Mecanismos de resistencia bacteriana	8
1.4 BETALACTAMASAS	9
1.4.1 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	10
1.4.2 Betalactamasas de clase A.....	13
1.5 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES QUE CONFIEREN LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	14
1.6 <i>ESCHERICHIA COLI</i> Y LA ENFERMEDAD DIARREICA.....	16
1.6.1 El humano y el cerdo como reservorios de <i>E. coli</i>	18
2 ANTECEDENTES.....	19
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
5 JUSTIFICACIÓN.....	23
6 HIPÓTESIS.....	24
7 OBJETIVOS.....	24
7.1 GENERAL	24
7.2 PARTICULARES	24
8 METODOLOGÍA	25
8.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	25
8.2 SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>E. COLI</i>	26
8.3 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS PRODUCTORAS DE BLEE	26
8.4 DETECCIÓN DE LOS GENES PARA BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (<i>BLATEM</i> , <i>BLASHV</i> Y <i>BLACTX-M</i>)	27
8.4.1 Extracción del DNA total.....	27
8.4.2 Diseño de oligonucleotidos para PCR.....	27
8.4.3 Amplificación de los genes <i>bla</i>	27

	8.4.4 Determinación del tipo de genes <i>bla</i>TEM, <i>bla</i>SHV y <i>bla</i>CTX-M	
	¡Error! Marcador no definido.	
	8.5 RELACIÓN CLONAL.....	29
	8.5.1 Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)	29
9	RESULTADOS.....	31
	9.1 SELECCIÓN DE CEPAS	31
	9.1 DETECCIÓN DE LOS GENES PARA BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO	
	(<i>BLATEM</i>, <i>BLASHV</i> Y <i>BLACTX-M</i>)	32
	9.2 ANÁLISIS MOLECULAR POR ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO	
	(PFGE).....	34
10	DISCUSIÓN	35
11	CONCLUSIONES	38
12	PERSPECTIVAS.....	39
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales mecanismos de acción de los antibióticos.	4
Figura 2. Estructura de las cefalosporinas mostrando el anillo betalactámico característico de antibióticos betalactámicos.	5
Figura 3. Mecanismos de resistencia bacteriana.....	9
Figura 4. Esquema funcional de los elementos genéticos móviles relacionados con integrones.....	15
Figura 5. Diagrama de flujo que muestra el esquema de trabajo para la realización del estudio.....	25
Figura 6. Selección de cepas humano por resistencia.	31
Figura 7. Selección de cepas de cerdo por resistencia.	32
Figura 8. Porcentaje de BLEEs encontradas en cepas de cerdo.	33
Figura 9. Porcentaje de BLEEs encontradas en cepas de humano.	34
Figura 10. Dendograma filogenético según el bandeo obtenido por PFGE.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de clasificación de betalactamasas.....	12
Tabla 2. Oligonucleotidos utilizados en la reacción de PCR.....	28
Tabla 3. Genes que codifican para BLEEs encontrados según la resistencia a cefalosporinas de tercera generación.	33

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública mundial. Un problema que es causado por el uso indiscriminado e irracional de antibióticos, el no acudir al dictamen de expertos, mal diagnóstico y por la automedicación. El uso inadecuado de antibióticos, además de representar un riesgo a la salud, contribuye al incremento en los gastos y mortalidad por enfermedades infecciosas. Los antibióticos betalactámicos, como ceftazidima y cefotaxima, son recomendados como terapia de primera línea para infecciones causadas por bacterias multirresistentes productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEEs). La emergencia de bacterias resistentes a betalactámicos es preocupante ya que las opciones para el tratamiento son limitadas [Pitout & Lanpland, 2008].

En bacterias Gram negativas la resistencia a betalactámicos se origina por varios mecanismos, pero el más importante, por su frecuencia y eficacia, es la producción de betalactamasas. Los genes que codifican para estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos y se producen de manera constitutiva o inducible.

De todas las betalactamasas descritas hasta el momento, cabe destacar, por su interés e implicaciones clínicas, las BLEEs (clase A), las betalactamasas tipo AmpC (cefalosporinas) y las carbapenemasas (clase D) [García *et al.*, 2014]. La diseminación de estos genes es una amenaza potencial debido a que el tratamiento basado en antibióticos es limitado.

En ganadería, la práctica habitual de tratar a los animales utilizando los antibióticos de forma profiláctica, en particular, haciendo uso de los agentes antimicrobianos definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), de importancia crítica en medicina humana [Collignon, 2009], como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, ha incrementado el número de bacterias entéricas resistentes en los animales de producción y consumo como el cerdo. Si estos animales al momento de ser enviados al matadero contienen

microorganismos resistentes, aumenta el riesgo de que estos microorganismos entren a la cadena alimentaria y por tanto lleguen al consumidor.

En respuesta a esta problemática, la identificación y caracterización genética de las BLEEs son parte fundamental de la política de control de la vigilancia de los antibióticos como lo recomienda la OMS para orientar el tratamiento adecuado y disminuir los fracasos terapéuticos a nivel nacional [OMS, 2014]. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es la identificación y caracterización de BLEEs en cepas de *Escherichia coli* aisladas en la interfase salud humana-animal.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Antibióticos

Los antibióticos o fármacos antimicrobianos son sustancias químicas que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos [Madigan *et al.*, 2009], estos pueden ser bactericidas (destruyen directamente a las bacterias) o bacteriostáticos (impiden su crecimiento) [Molina & Eslava, 2015], y de acuerdo a su espectro de acción pueden ser de amplio espectro (aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes) o de espectro reducido (antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies) [Paredes & Zurita, 2013].

Los mecanismos de acción de los fármacos antimicrobianos más comunes son a) la inhibición de la síntesis de la pared celular, al impedir la síntesis de peptidoglicano; b) la inhibición de la síntesis de proteínas, mediante la interferencia sobre la actividad de los ribosomas; c) la alteración de la membrana citoplasmática, al producir cambios en la permeabilidad de la membrana; d) la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, interfiriendo con los procesos de replicación y transcripción del DNA; y e) la inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales, donde se inhibe una vía enzimática de síntesis de un metabolito mediante compuestos que compiten con el sustrato normal por una enzima (Figura 1) [Tortora *et al.*, 2007].

Actualmente, los principales grupos de agentes antimicrobianos con actividad contra patógenos Gram negativos son: antibióticos betalactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas y quinolonas.

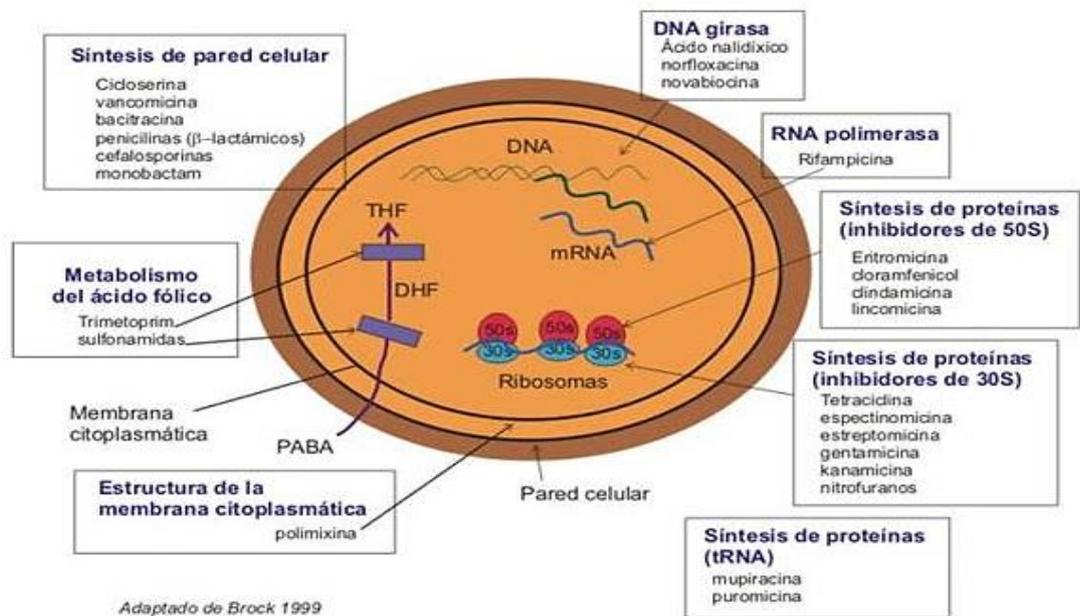


Figura 1. Principales mecanismos de acción de los antibióticos.

1.2 Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos constituyen la familia más numerosa de los antimicrobianos, y la más utilizada en la parte clínica, ya que son medicamentos de primera línea en el uso rutinario de todas las especialidades médicas. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis del peptidoglicano componente principal de la pared celular, en la que intervienen las proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Son compuestos de acción bactericida lenta, dependiente del tiempo, con escasa toxicidad y amplio margen terapéutico. La familia de los betalactámicos consiste de cuatro principales grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a ésta familia de antibióticos (Figura 2). [Gudiol & Marín, 2003; Calvo & Martínez, 2009].

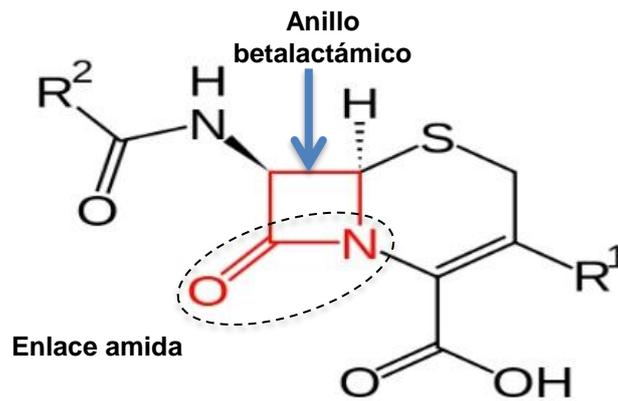


Figura 2. Estructura de las cefalosporinas mostrando el anillo betalactámico característico de antibióticos betalactámicos.

1.2.1 Cefalosporinas

Las cefalosporinas son agentes antibacterianos que pertenecen al grupo de los betalactámicos, es decir, poseen un anillo betalactámico fusionado con un anillo dihidrotiazínico constituyendo el núcleo cefem del que derivan todas las cefalosporinas, a diferencia de las penicilinas que también poseen el anillo betalactámico pero fusionado a un anillo tiazolidínico de cinco miembros [Mella *et al.*, 2001].

Las cefalosporinas, al igual que otros antibióticos betalactámicos, ejercen su actividad antibacteriana inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, produciendo finalmente lisis bacteriana [Friend & Hinthom, 1985; Thompson, 1987]. El mecanismo de acción deriva de la unión covalente del betalactámico al sitio activo de las proteínas de unión a la penicilina críticas (PBPs por sus siglas en inglés) responsables de la elongación y la formación de los enlaces cruzados del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Esto inhibe el crecimiento y también resulta en daño a la pared celular, lo cual frecuentemente conlleva a la lisis y muerte celular. En bacterias Gram negativas, las cefalosporinas primero deben entrar al espacio periplasmático, entre la pared celular y la membrana celular, a través de los canales en la membrana que normalmente funcionan como paso para la adquisición de nutrientes esenciales para la bacteria. La habilidad para pasar a través de estos canales, junto con la alta afinidad por las

PBPs y la resistencia a un amplio rango de betalactamasas, se consideran como la base de su amplio espectro de actividad comparado con otros antibióticos.

1.3 Resistencia antimicrobiana

El uso de antimicrobianos, ya sea de manera terapéutica o no, expone a las bacterias patógenas y a la microbiota comensal a una presión selectiva generada por el agente antimicrobiano. Esta presión puede resultar en la aparición de resistencias, o si una población de bacterias resistentes está presente, al aumento de esta [Weese *et al.*, 2015]. Debido a ello, se han generado microorganismos resistentes a múltiples fármacos, sugiriendo el término de multidrogo resistencia (MDR), definida como la resistencia adquirida por lo menos a un fármaco en tres o más familias de antibióticos diferentes, los que se clasifican como extremadamente resistentes (XDR) que son resistentes al menos a un antibiótico en todas las familias excepto dos o menos, y el pandrogo resistente (PDR) cuando son resistentes a todos los antibióticos en todas las familias de antibióticos [Magiorakos *et al.*, 2012].

1.3.1 Resistencia en la interfase salud humana–animal

Los fármacos antimicrobianos han sido ampliamente usados en ganado y aves desde la década de 1950. Su uso en animales destinados a consumo humano proporciona beneficios como la mejora de la salud animal, una mayor producción y la reducción de patógenos transmitidos por los alimentos. Sin embargo, el uso de antibióticos con fines agrícolas, en particular en la mejora del crecimiento, ha sido objeto de estudio, ya que se ha demostrado que contribuye a una prevalencia mayor de bacterias resistentes a los antibióticos de importancia humana [Mathew *et al.*, 2007].

El efecto promotor del crecimiento de animales con bajas dosis de antimicrobianos se descubrió a finales de la década de 1940, y se ha convertido en parte integral de la crianza intensiva de animales. En muchos países, la promoción del crecimiento animal usando varios antimicrobianos está autorizada y es ampliamente practicada. El efecto de las bajas dosis de antibióticos para la

promoción del crecimiento animal sobre la resistencia antimicrobiana ha sido bien documentado por décadas. Por ejemplo, el uso del glicopéptido avoparcina fue asociado con la selección de enterococos resistentes a vancomicina [Laxminayaran *et al.*, 2013].

Muchas veces estos antibióticos son administrados en comida o agua como preventivos. Con algunas excepciones, los grupos de antimicrobianos usados son los mismos usados en la medicina humana. Sin embargo, los tipos más nuevos de antimicrobianos, como los carbapenems, oxazolidinonas y glicilglicinas hasta ahora no son utilizados en animales criados para el consumo humano [Laxminayaran *et al.*, 2013].

La interfase entre seres humanos y animales es compleja; existen numerosas vías posibles para la transmisión de bacterias resistentes. El hecho de que los genes de resistencia pueden ser transferidos entre diferentes especies de bacterias comensales y de éstas a los patógenos añade complejidad. La exposición a través del alimento, es la ruta de transmisión más estudiada y la más importante. La fuente más probable de bacterias resistentes en alimento de origen animal es la contaminación desde los intestinos de los animales durante el sacrificio, pero hay otras numerosas etapas en la producción del alimento donde la contaminación con microorganismos, o amplificación o reducción de sus números puede ocurrir [Laxminayaran *et al.*, 2013].

En un estudio experimental, donde se inoculó una cepa de *E. coli* con marcadores de resistencia, un plásmido R, a un animal (pollo) cuyo alimento se suplementó con antibióticos, se demostró la diseminación de microorganismos resistentes de animal a animal y de animales a humanos. En este experimento se tomaron muestras de heces a los trabajadores de la granja, a sus familias y a los trabajadores del laboratorio. La bacteria con los marcadores de resistencia se encontró en humanos dos veces: la primera en el hijo del dueño de la granja, y la segunda en un trabajador del laboratorio que recolectaba las muestras. El mecanismo de transmisión, por aire o en la ropa de los trabajadores, no fue conocido [Levy *et al.*, 1976].

1.3.2 Mecanismos de resistencia bacteriana

Un antibiótico necesita alcanzar su diana de acción, a una concentración suficiente y durante el tiempo adecuado, para poder inhibir el crecimiento o causar la muerte bacteriana. Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos (Figura 3). Teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición, y que la selección de estos mecanismos puede llevar a falla terapéutica tanto a nivel de granja, como a nivel hospitalario, es importante conocer los mecanismos más prevalentes en las bacterias Gram negativas como *E. coli* [Torres 2012; Tafur *et al.*, 2008].

Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos son:

- 1) **Modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad.
- 2) **Bombas de expulsión:** operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción.
- 3) **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico.
- 4) **Alteraciones del sitio de acción:** las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital

de ésta. La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano.

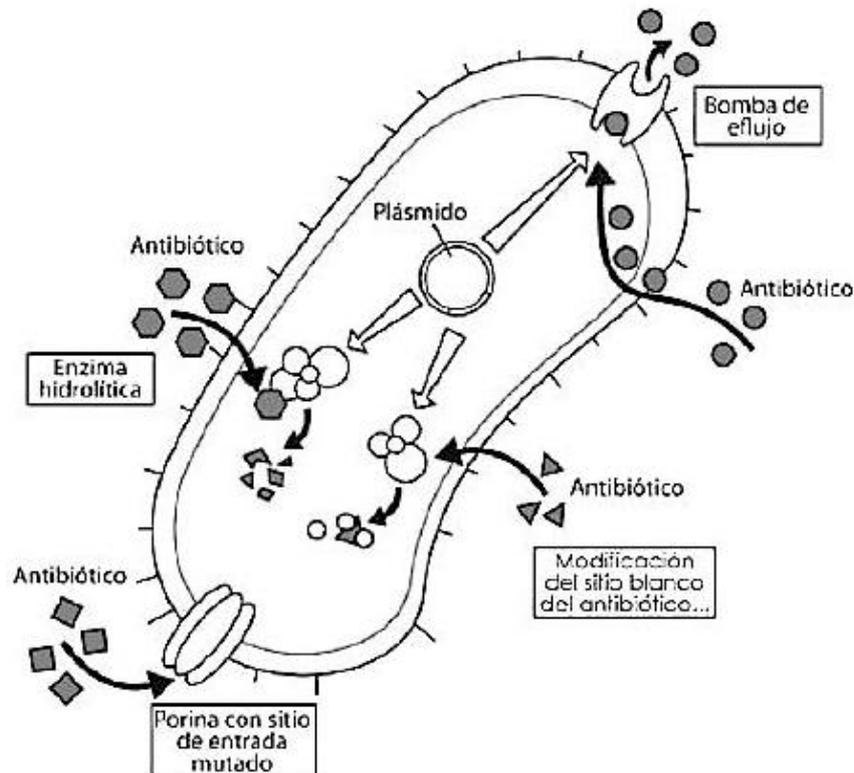


Figura 3. Mecanismos de resistencia bacteriana.

1.4 Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico común en todos los antibióticos betalactámicos y están ampliamente distribuidas en bacterias Gram negativas y Gram positivas. La categorización de las enzimas betalactamasas puede ser definida de acuerdo a dos propiedades: la **funcional** y la **molecular**. La **clasificación funcional** divide a las betalactamasas conocidas dentro de cuatro principales grupos funcionales (grupos 1 a 4), con múltiples subgrupos dentro del grupo 2, que son diferenciados de acuerdo al espectro de sustrato específico de grupo o a los perfiles de inhibición.

En la **clasificación molecular**, las enzimas son categorizadas en cuatro clases moleculares, las cuales son: A, B C y D incluyen las betalactamasas que requieren serina en el sitio activo para romper el anillo betalactámico de

penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Estas enzimas rompen el enlace amida del anillo betalactámico inactivando el antibiótico, mientras que las enzimas que están dentro de la clase molecular B requieren iones metálicos (usualmente Zinc) para realizar la hidrólisis (Tabla 1) [Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995].

1.4.1 Betalactamasas de espectro extendido (BLEEs)

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) son consideradas como un mecanismo de resistencia de los microorganismos Gram negativos a los antibióticos betalactámicos, hidrolizan a las cefalosporinas de espectro extendido que contienen una cadena lateral oximino como cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y monobactámicos (aztreonam), pero no actúan sobre las cefamicinas (cefotetan, cefoxitina), ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem) [Aguilar, 2016].

Las BLEEs han emergido en las dos últimas décadas como un problema creciente que dificulta el tratamiento de infecciones producidas por las bacterias portadoras. Su aparición se asocia al uso excesivo de las cefalosporinas de espectro extendido y el aztreonam. Fue en los años 80 cuando se introdujeron en la práctica clínica las cefalosporinas de tercera generación, las cuales fueron desarrolladas en respuesta a un incremento en la prevalencia de betalactamasas en algunos microorganismos y a la extensión de estas a nuevos hospedadores.

Estas cefalosporinas presentan menor toxicidad que los aminoglucósidos y las polimixinas, de ahí que tienen un uso mayor [Paterson y Bonomo, 2005].

La mayoría de estas enzimas se ha originado por medio de mutaciones espontáneas de betalactamasas de espectro reducido por cambios en los aminoácidos en su sitio activo, lo que permite ampliar su capacidad hidrolítica. Usualmente, las BLEE tipo TEM y SHV hidrolizan a ceftazidime con mayor eficiencia que a ceftriaxona o cefotaxime, mientras que las CTX-M, usualmente, hidrolizan cefotaxime y ceftriaxona más rápidamente que ceftazidime [Morejón, 2013].

Este mecanismo de resistencia está dado por los genes *bla* TEM, SHV y CTX-M. Las TEM provienen de las clásicas TEM-1 y TEM-2 contenidas en plásmidos, mientras que las SHV tienen origen cromosómico. Las CTX-M, de historia evolutiva distinta, tienen actividad BLEE intrínseca, y son las BLEE de mayor reporte mundial, predominando en agentes de infecciones nosocomiales (IN) como *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. [Rivera *et al.*, 2015].

Las betalactamasas son inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de estas como el sulbactam o tazobactam [Paterson y Bonomo, 2005], estos no son propiamente un antibiótico pero son estructuralmente parecidas, ya que tienen una estructura parecida al anillo betalactámico que las betalactamasas rompen e hidrolizan, con la diferencia de que cuando la enzima se une a la molécula del inhibidor esta es incapaz de desprenderse deteniendo su acción sobre las moléculas de antibiótico, luego el inhibidor se destruye y por lo tanto también la betalactamasa [Gómez *et al.*, 2015]

Tabla 1. Esquema de clasificación de betalactamasas.

CLASIFICACIÓN			Sustrato distintivo	Inhibido por		Característica definitoria	Enzimas representativas
Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Ambler		CA/ TZB	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Fuerte hidrólisis de cefalosporinas y bencilpenicilinas, hidrolizan cefamicina	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis aumentada para ceftazidima y frecuentemente otros oxymimolactámicos.	GC1, CMY-37
2*	2*	A	Penicilinas	Si	No	Hidrólisis mayor de bencilpenicilinas que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de primera generación	Si	No	Hidrólisis similar en bencilpenicilinas y cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactam	Si	No	Hidrólisis incrementada en oxy-iminolactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistente al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactam	No	No	Hidrólisis aumentada para oxymino-lactámicos combinado con resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Si	No	Hidrólisis aumentada para carbenicilina.	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepime	Si	No	Hidrólisis aumentada para carbenicilina, cefepime y ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis aumentada para cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de amplio espectro	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oxymimolactámicos.	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenemes	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenemes	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de amplio espectro	Si	No	Hidrólisis de cefalosporinas, inhibidores suicidas como el ácido clavulánico pero no aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenemes	Variable	No	Hidrólisis aumentada de carbapenemes, oxymimolactámicos y cefamicinasl.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3*	3	B1/B3	Carbapenemes	No	Si	Amplio espectro de hidrólisis, incluido carbapenemes pero no monobactames.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 / L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B2	Carbapenemes	No	Si	Hidrólisis preferencial por los carbapenemes.	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown	--	--	--	--	--

CA: ácido clavulánico; TZB: Tazobactam; NI: no incluido

Modificado de: (Bush & Jacoby, 2010)

1.4.2 Betalactamasas de clase A

- a) **Betalactamasa tipo TEM**, primera enzima mediada por un plásmido y encontrada en una enterobacteria, fue la TEM-1 aislada en *E. coli* en 1965. El nombre de TEM es una contracción de Temoniera, nombre del paciente del que aislado. Se han expandido desde su origen en un 60% entre las enterobacterias; su frecuencia varía con la especie y el lugar. En *E. coli* es la responsable de la resistencia a la ampicilina [Aliaga, 2002; Silva, 2017].

- b) **Betalactamasa tipo SHV**, es una contracción de sulfhidrilo variable, una descripción de las propiedades bioquímicas de esta betalactamasa. La SHV-1 fue también llamada PIT-2, porque fue por primera vez descrito por Pitton en 1972. Los genes que codifican para esta enzima se encuentran en el cromosoma, mientras que las variantes alélicas se derivan de plásmidos. La SHV-1 plasmídica ha sido detectada principalmente en *Klebsiella* hasta un 94% de las cepas que producen resistencia a la ampicilina. A mediados de 1990, SHV se convirtió en la enzima más frecuente BLEE, sin embargo, este grupo ha sido desplazado actualmente por las enzimas CTX-M. A pesar de que SHV es más común que se encuentre en *K. pneumoniae*, se han reportado casos en otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* como *E. coli* [Aliaga, 2002; Silva, 2017].

- c) **Betalactamasa tipo CTX-M**, una de las familias de BLEEs más prevalente en los últimos tiempos es CTX-M (**C**efo**TaX**imase **M**unich), reportada en 1989 a partir de un aislamiento de *E. coli* de la secreción del oído de un niño de cuatro meses en Munich, Alemania. Estas enzimas reciben el nombre de cefotaximasas por su especial actividad contra la cefotaxima, así como otros substratos betalactámicos como ceftazidima, ceftriaxona, o cefepime. Este genotipo es un buen ejemplo de betalactamasas cromosómicas, encontradas normalmente en especies de "*Kluyvera*", un grupo relativamente raro de patógenos comensales. Estas enzimas no están muy relacionadas con las TEM o SHV, ya que solo muestran un 40% de identidad con las mismas. Actualmente se

conocen más de 80 tipos de CTX-M, de las cuales algunas son más activas contra ceftazidima que contra cefotaxima. Se han encontrado en cepas de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* y en *E. coli* [Aliaga, 2002; Silva, 2017].

Se reconocen más de 120 variantes de CTX-M alrededor del mundo, las cuales se encuentran divididas en cinco subclases en función de la homología en la secuencia de aminoácidos, llamadas CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. Los tipos más predominantes son CTX-M-14 (grupo CTX-M-9), CTX-M-3 (grupo CTX-M-1), y CTX-M-2 (grupo CTX-M-2) [Livermore *et al.*, 2007; Silva, 2017]. La CTX-M-15 (grupo CTX-M-3) es el tipo de BLEE con mayor prevalencia en aislamientos de *E. coli* en el Reino Unido presentando una potente acción frente a ceftazidima [Poirel *et al.*, 2001].

Hasta finales de 1990s las BLEE más frecuentemente encontradas eran derivadas de TEM y SHV principalmente en *K. pneumoniae* y en pacientes hospitalizados [Yuan *et al.*, 1998]. En la actualidad las enzimas CTX-M están reemplazando a las TEM y SHV y está aumentando el porcentaje de aislamientos en *E. coli* y en pacientes comunitarios. En España la CTX predominante es el grupo CTX-M-9 [Livermore *et al.*, 2007].

1.5 Elementos genéticos móviles que confieren la resistencia a antibióticos

La gran plasticidad de los genomas bacterianos ha permitido su adaptación frente a la presión selectiva ejercida por la terapia con antibióticos; esta versatilidad se encuentra mediada por elementos genéticos que permiten la reorganización de genes y la diseminación de determinantes de resistencia por transferencia horizontal. Dentro de este contexto, los integrones juegan un papel importante al ser plataformas de recombinación sitio-específica con capacidad de incorporar y expresar genes en casete. Se han descrito un gran número de genes en casete con capacidad de conferir resistencia a diversas familias de antimicrobianos. Dichas estructuras genéticas pueden incorporarse en los

integrones y formar colecciones de genes que confieren multiresistencia a antibióticos. Los integrones se encuentran frecuentemente asociados a estructuras genéticas móviles como plásmidos y transposones lo cual los convierte en los personajes centrales para la dispersión horizontal intra e interespecífica de genes (Figura 4) [Paredes & Zurita, 2013; Romero, 2013; Silva, 2017].

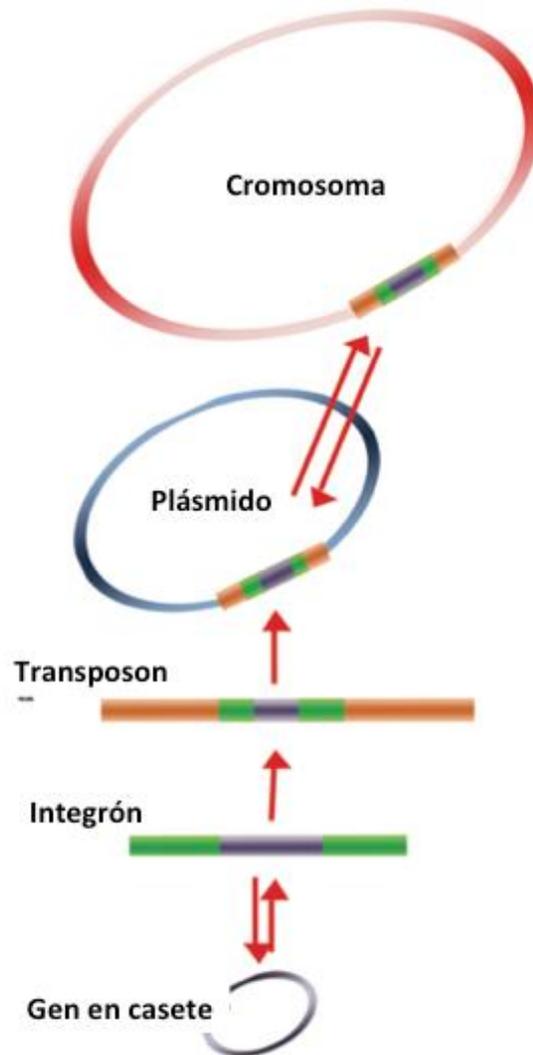


Figura 4. Esquema funcional de los elementos genéticos móviles relacionados con integrones. Los genes en casete se recombinan en la región variable del integrón, el cual puede estar dentro de un transposón que le permite movilizarse entre secuencias de DNA (Paredes & Zurita, 2013).

Muchos de los arreglos de genes en casete descritos en Latinoamérica incluyendo México se relacionan con resistencia a familias de antibióticos de amplio uso clínico como β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos lo cual

produce un marcado incremento en el fracaso terapéutico, al proporcionar a los patógenos bacterianos una combinación de genes de resistencia a los compuestos más empleados en el tratamiento de infecciones bacterianas.

La resistencia bacteriana puede ser adquirida mediante mutaciones en la secuencia del DNA cromosomal o por la adquisición de los elementos móviles por conjugación, transducción y transformación [Paredes y Zurita, 2013; Romero, 2013; Silva, 2017].

1.6 *Escherichia coli* y la enfermedad diarreica

Las enterobacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza: en la tierra, el agua, las plantas e intestino de humanos y animales. Son bacilos Gram negativos, oxidasa negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, capsulados, Pueden desarrollarse en cultivos desde los 20°C hasta los 37°C en un tiempo de 18 a 24 horas. Dentro de esta familia, *Escherichia coli* y los géneros *Shigella* y *Salmonella* son los agentes etiológicos más importantes de enfermedades diarreicas [Carroll *et al.*, 2017].

Hasta 1950, *E. coli* era considerada como un habitante no patógeno del tracto intestinal de animales de sangre caliente y humanos. Sin embargo, en las últimas décadas, una gran cantidad de investigaciones ha establecido a *E. coli* como un importante agente etiológico de enteritis. Se trata de una enterobacteria móvil, catalasa positiva, oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito, normalmente fermenta la lactosa, produce indol a partir del triptófano siendo negativa la reacción de Voges-Proskauer, causante de diarreas agudas [Mandell *et al.*, 1979].

La diarrea aguda es una enfermedad intestinal generalmente infecciosa y autolimitada, se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas o de consistencia disminuida, en número mayor a tres en 24 horas y con evolución menor de dos semanas. Diarrea persistente se define como el paso de

evacuaciones semilíquidas por más de dos semanas, en tanto que la diarrea crónica se establece a las cuatro semanas [Molina y Eslava, 2015].

La enfermedad diarreica grave (EDA), es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia en el mundo. De acuerdo con estudios efectuados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el fondo de las naciones unidas para la infancia (UNICEF), las EDA son un problema de salud de la población infantil, principalmente en los países en desarrollo donde se producen anualmente entre cinco a seis millones de muertes, constituyendo la segunda causa global de mortalidad infantil [Estrada *et al.*, 2009].

La diarrea afecta a todos los grupos de edad. El periodo pediátrico de mayor vulnerabilidad incluye a los menores de cinco años (SSA), quienes se deshidratan con mayor rapidez. En México, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) estima que se recetan antibióticos a 70% de los pacientes con infecciones respiratorias y diarreicas agudas, lo que se justifica solamente en un 15% de los casos [INSP, 2020]

E. coli es responsable de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año, afectando principalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además, se ha reportado su participación en cerca del 50% de las infecciones urinarias intrahospitalarias y en el 90% de las infecciones de este tipo en pacientes ambulatorios [Molina y Eslava, 2015].

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis tipos patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). Cada uno de los grupos patógenos de *E. coli* presenta características distintivas relacionadas con su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento [Estrada *et al.*, 2009; Molina y Eslava, 2015].

1.6.1 El humano y el cerdo como reservorios de *E. coli*

E. coli es el agente etiológico de un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales, algunas de ellas extraintestinales y otras entéricas, dentro de las cuales se encuentra la diarrea de los lechones (colibacilosis en neonatos y post–destete) y la enfermedad de los edemas. Se caracterizan por ser endémicas, altamente transmisibles y por presentar un desenlace generalmente fatal, originando considerables pérdidas económicas en lechones entre las cuatro y doce semanas de edad [Cicuti *et al.*, 2000].

En otros animales *E. coli* se encuentra regularmente en las heces del ganado sano y es transmitida al hombre principalmente por la ingestión de productos porcinos; aunque se ha relacionado también con la leche no pasteurizada, bebidas contaminadas como el agua, verduras frescas y a través del contacto persona a persona por ello las enfermedades de transmisión alimentaria constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial [Soto *et al.*, 2016].

2 ANTECEDENTES

En los últimos años, la causa predominante de resistencia a las cefalosporinas en *E. coli* es la producción de plásmidos que codifican BLEE de la familia CTX-M, la cual se encuentra diseminada por todo el mundo [Hunter *et al.*, 2010].

Aunque en principio, las BLEE fueron aisladas de pacientes hospitalizados, actualmente han ocurrido aislamientos en cepas de infecciones adquiridas en la comunidad y en animales de sangre caliente como cerdos. A partir del año 2000 se ha observado un aumento de aislamientos de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M, principalmente, están implicadas en Infecciones del Tracto Urinario (ITU) y gastrointestinales [Coque *et al.*, 2008].

Los primeros casos de enterobacterias productoras de BLEE fueron detectados en Europa en 1983 y las primeras variantes caracterizadas fueron SHV-2 y TEM-2 en pacientes hospitalizados. Además, en 1986 se detectó en Francia el primer brote nosocomial de *K. pneumoniae* con la variante TEM-3, produciéndose un aumento dramático de los casos de BLEE en los años sucesivos, en todo el mundo. Los primeros informes sobre organismos productores de BLEE en Estados Unidos fueron en 1988. En 1989, se informan casos de infecciones producidas por variantes SHV y CTX-M en Canadá y Estados Unidos.

Una investigación realizada en España en 2010 sobre los mecanismos de resistencia de *E. coli* resistente a cefalosporinas en cerdos reportó que después de un muestreo de 80 granjas de cerdos, se obtuvieron 29 aislamientos de *E. coli*, 21 (72%) positivos para BLEE, detectando SHV-12 (12 aislamientos, 41%), CTX-M-1 (tres aislamientos, 10%), CTX-M-9 (tres aislamientos, 10%) y CTX-M-14 (tres aislamientos, 10%). Los ocho aislamientos restantes (28%) fueron fenotípicamente no BLEE [Escudero *et al.*, 2010]. Por otra parte, en un trabajo comunitario realizado en Alemania de octubre 2009 a noviembre 2012, detectaron en 211 personas de 3,344 participantes colonizados por *E. coli* BLEE, que la mayoría de estas cepas aisladas pertenecieron al tipo enzimático CTX-M (46% CTX-M-15 y 24% CTX-M-1) [Valenza *et al.*, 2014].

En América Latina los primeros reportes sobre BLEEs ocurren en el año de 1989. En la actualidad, esta región tiene la tasa más elevada del mundo, existiendo variaciones dentro de los países que la forman, y siendo los de mayor prevalencia Brasil y Chile, donde se han detectado enzimas de tipo CTX-M, PER, TEM y SHV [Villegas *et al.*, 2008]. En México, los primeros casos de cepas CTX-M fueron reportados en el año 2009 por Rocha y colaboradores, donde detectaron un determinante de resistencia a quinolonas transmitido por el plásmido qepA1 en cepas de *E. coli* productora de CTX-M-15.

En un estudio realizado entre octubre de 2010 y marzo de 2011 se colectaron 460 aislamientos de *E. coli* y 78 de *K. pneumoniae* de un hospital de nivel tres de atención en Guadalajara, México. Los resultados que se obtuvieron evidenciaron la presencia de BLEEs en 75/460 (16.3%) aislados de *E. coli* y 21/78 (26.9%) de *K. pneumoniae*. El tipo de BLEE encontrada fue CTX-M-15 en 85% de *E. coli* productora de BLEE y 76% en *K. pneumoniae* [Morfin *et al.*, 2013].

El Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México reportó en 2012 115 pacientes inmunosuprimidos por leucemia, en donde 34% de los hemocultivos estudiados se relacionaron con *E. coli* BLEE. De esta población 56 de los pacientes con aislamiento de *E. coli* BLEE fueron caracterizados por análisis molecular, encontrando la expresión de CTX-M-15 en 84% de las muestras [Aguilar, 2016].

En Perú, en un estudio realizado de julio 2012 a marzo 2013 se analizaron 235 muestras fecales de pacientes con gastroenteritis que acudieron al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño en Lima, encontrando una alta frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE 64.2% (131/235) siendo *E. coli* (86.1%), *K. pneumoniae* (7.9%), *Salmonella* sp. (2.6%), *Enterobacter cloacae* (2.0%) y *Proteus mirabilis* (1.3%). El 89.1% de estas enterobacterias productoras de BLEE presentaron el gen *bla*CTX-M [Colquechagua *et al.*, 2015].

En el año 2016, se reporta, en Ciudad de México, un estudio en el Instituto Nacional de Pediatría (IPN) sobre la presencia de CTX-M-9 en aislamientos de

E. coli de pacientes pediátricos (0-18 años de edad). Las BLEEs del grupo CTX-M-9 se detectaron en 2.5% (10/404) de los aislamientos siendo las variables alélicas encontradas CTX-M-14 (4/10) y CTX-M-27 (6/10). Otro reporte en Morelos, México identificaron la prevalencia de los genes de BLEE mostrando que los genes *bla*CTX-15 fueron los más comunes, seguidos del tipo SHV-12 y SHV-5 [Barrios *et al.*, 2017].

En 2017, en Venezuela, se realizó un estudio sobre la diversidad genética de cepas extraintestinales de *E. coli* productora de BLEE donde se observó que el gen más frecuente en 12 cepas extraintestinales fue CTX-M-8 seguida por CTX-M-15 y CTX-M-2. Mientras que en dos cepas se evidenció la presencia simultánea de *bla*CTX-M-9 variantes *bla*CTX-M-65 (primer reporte en Venezuela) y *bla*CTX-M-147 (primer reporte en el mundo) [Varela *et al.*, 2017]. En el mismo año, pero en Cuba, se realizó un estudio para detectar enterobacterias productoras de BLEEs en granjas porcinas colectando 200 muestras fecales de las cuales se identificaron 41 aislados de enterobacterias determinando la mayor frecuencia después de analizar los amplicones para el gen *bla*CTX-M seguido del gen *bla*TEM, mientras que el gen *bla*SHV no se detectó [Marrero *et al.*, 2017].

Más reciente, en 2018, se reporta un estudio descriptivo en Oaxaca, México donde se incluyeron 288 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes adultos con posible infección en vías urinarias. Del total de las cepas de *E. coli* aisladas, 31.3% (90/288) fueron productoras de BLEE, 86 de ellas (95.6%) fueron positivas para CTX-M, 16 (17.8%) para TEM, ninguna para SHV y cuatro (4.4%) resultaron negativas para los tres genes analizados, lo que sugiere la presencia de otro gen menos común productor de BLEE como *bla*OXA o *bla*TLA-1 [Galindo, 2018].

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente en México y en todo el mundo se está enfrentando una dura batalla contra los microorganismos resistentes a una gran variedad de antibióticos. El ambiente hospitalario, uno de los hábitats predilectos de *E. coli*, y su elevado consumo de antibióticos, proporciona la presión de selección necesaria para el desarrollo de microorganismos multidrogo resistentes comensales o patógenos. Existe evidencia de la asociación entre la cadena alimentaria y diarrea aguda causada por bacterias resistentes; sin embargo, es pertinente aportar más evidencias sólidas sobre el impacto del uso de antibióticos en bacterias resistentes causantes de diarrea y su asociación con la interfase salud humana-animal, utilizando modelos de estudios dinámicos y concurrentes [OMS, 2014].

E. coli tiene acceso a una gran selección de genes de resistencia propios de su especie, y ha desarrollado mecanismos capaces de reordenar estos genes y movilizar-capturar genes de resistencia, a través de elementos móviles como los plásmidos. Al momento se han identificado 186 variantes alélicas de SHV que han desarrollado resistencia a las cefalosporinas de tercera generación [Liakopoulos *et al.*, 2016], monobactam y carbapenems [Poirel *et al.*, 2003], cinco clases de β -lactamasas tipo CTX-M adquiridas denominadas: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 y más de 100 clases de TEM, cuyos determinantes genéticos están usualmente asociados con elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y transposones.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se comparte el mismo tipo de betalactamasa de espectro extendido entre las cepas de *Escherichia coli* de humanos y cerdos?

5 JUSTIFICACIÓN

El incremento de resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema global de salud pública importante que está asociado a diversos factores, entre los cuales, el uso clínico indiscriminado y en la industria pecuaria como promotores de crecimiento son considerados elementos claves de selección del evento. Las enfermedades diarreicas por *Escherichia coli* son una de las principales causas de morbi-mortalidad en niños menores de cinco años, tanto en países desarrollados como en desarrollo, incluido nuestro país, donde en el año 2008 fueron la cuarta causa de mortalidad infantil (menores de un año) y la primera causa de mortalidad en pre-escolares (1 a 4 años).

Se ha mostrado que, la resistencia bacteriana a los antibióticos mediada por la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituye uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia en el entorno hospitalario y en los casos de brotes epidemiológicos, así como en las granjas de producción animal ya que este mecanismo de resistencia se puede difundir a la población por contacto directo o a través de la cadena alimenticia. El impacto sobre la salud pública, la importancia del control de densidad poblacional en animales de crianza y el control del uso de antimicrobianos, no serían posibles sin estudios previos del hallazgo de las BLEEs en bacterias procedentes de animales que están en profunda relación y contacto con la humanidad. La información obtenida mediante este estudio es de gran utilidad para México ya que aporta evidencia científica para apoyar la regulación del uso racional de antibióticos tanto en el ámbito clínico en humanos y animales como en el crecimiento de animales con fines comerciales.

6 HIPÓTESIS

El tipo de BLEE producido por las cepas de *Escherichia coli* será el mismo entre las cepas aisladas de humanos y de cerdos.

7 OBJETIVOS

7.1 General

Identificar los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE aisladas de humanos y cerdos.

7.2 Particulares

1. Confirmar fenotípicamente la producción de BLEEs en cepas de *E. coli* aisladas de humanos y cerdos.
2. Establecer si las BLEEs están más seleccionadas en cepas de *E. coli* patógenas que en las comensales.
3. Determinar los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de humanos y cerdos.
4. Establecer la relación clonal de las cepas de *E. coli* portadoras de un gen para BLEE aisladas de humanos y cerdos.

8 METODOLOGÍA

8.1 Diseño experimental

Se realizó un estudio descriptivo a partir de un modelo de interfase salud humana-animal en Jiutepec, Morelos, México; que incluyó una granja porcícola y tres centros de salud cercanos a la granja: Jiutepec, Huizachera y Calera Chica. Además, se incluyeron los pacientes referenciados al Hospital General de Cuernavaca “Dr. José G. Parres” quienes presentaban síntomas de enfermedad diarreica. El esquema de trabajo propuesto se muestra en la figura 5.

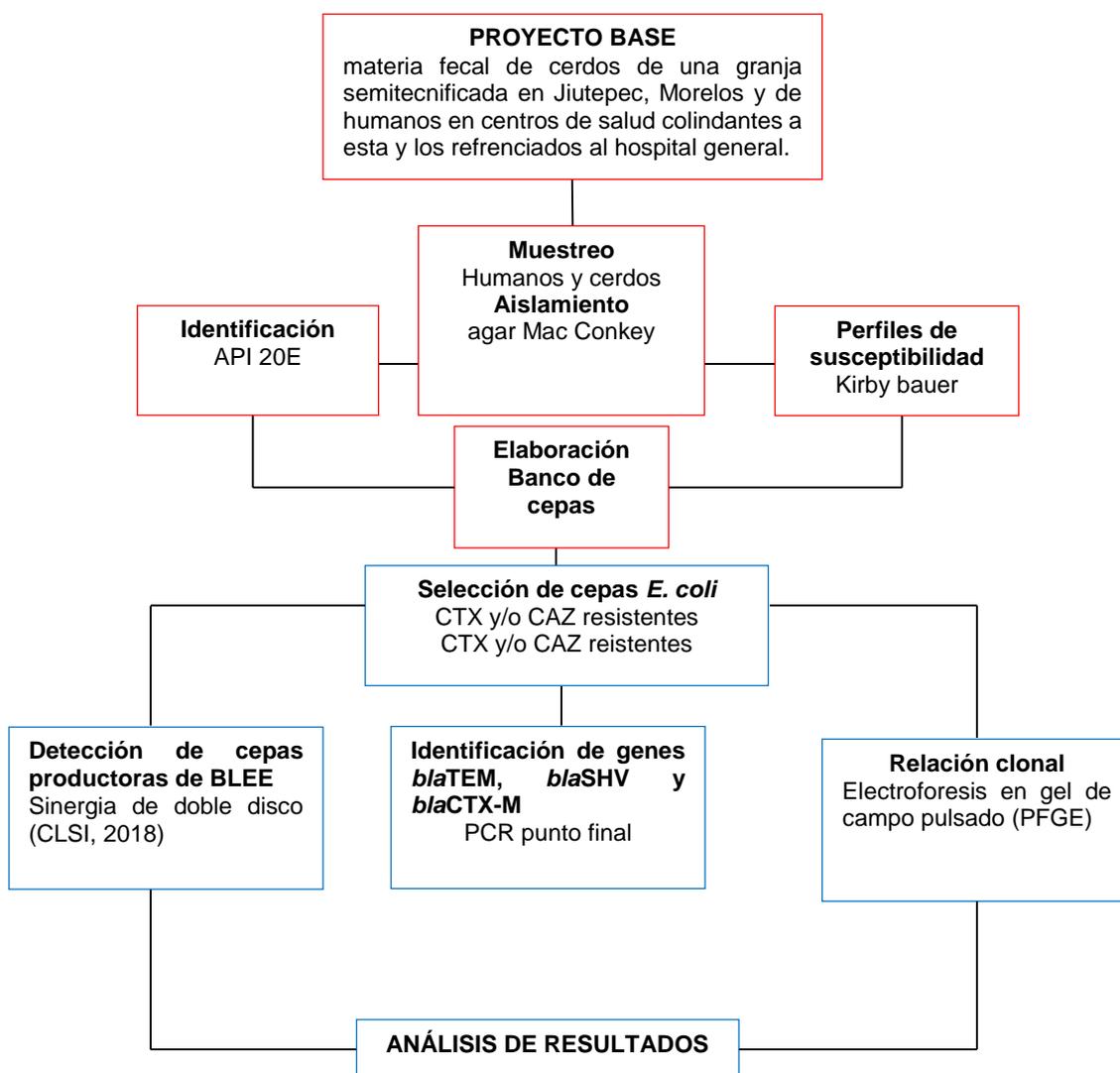


Figura 5. Diagrama de flujo que muestra el esquema de trabajo para la realización del estudio, en rojo lo que se realizó en el proyecto base y en azul lo que se realizó en este proyecto.

8.2 Selección de cepas de *E. coli*

Se seleccionaron las cepas de *E. coli* resistentes a ceftazidima y/o cefotaxima a partir de un banco de cepas de *E. coli* previamente identificadas y con un perfil de susceptibilidad antimicrobiano antes establecido.

8.3 Detección fenotípica de cepas productoras de BLEE

La detección de cepas sospechosas de producir una BLEE se confirmó fenotípicamente mediante el método de sinergia con doble disco donde se requirieron discos con antibiótico: cefotaxima (CTX) 30µg, CTX/ácido clavulánico (AC) 30/10µg y ceftazidima (CAZ) 30µg, CAZ/ácido clavulánico (AC) 30/10µg siguiendo los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [CLSI, 2018].

Posteriormente, las cepas de *E. coli* seleccionadas se crecieron a 37°C en medio de cultivo agar Mac Conkey suplementado con CAZ o CTX a 2 µg/mL, para verificar que sea un cultivo puro. Subsecuentemente, se realizó una suspensión bacteriana en tubos de ensayo con solución salina (NaCl 0.85%) para ajustarla en un rango de 0.08 a 0.135 de absorbancia, a una longitud de onda de 625 nm, para alcanzar una concentración al 0.5 en la escala de McFarland (1x10⁸ UFC). La solución bacteriana ajustada se difundió en placas de agar Müller-Hinton (MH: MCD®, México) mediante un hisopo estéril y sobre esta se colocaron los discos con antibiótico a una distancia de 2 cm de disco a disco. Las placas se incubaron a ±35°C por 18 horas.

Para interpretar los resultados se midieron los halos de inhibición de cada antibiótico solo y de antibiótico/inhibidor; después para determinar si las cepas de *E. coli* son BLEE positivas se utilizó la siguiente regla: Sí la diferencia entre el diámetro del halo de inhibición entre CAZ y CAZ/CLA o CTX y CTX/CLA es ≥5mm se considera una posible *E. coli* productora de BLEE (*E. coli*-BLEE).

8.4 Detección de los genes para betalactamasas de espectro extendido (*bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M)

8.4.1 Extracción del DNA total

La extracción de DNA total se realizó mediante la técnica de choque térmico, tomando de una a dos colonias puras de *E. coli* a partir de un cultivo fresco en agar Mac Conkey y se resuspendió en un tubo eppendorf con 300 µL de agua destilada. Posteriormente, se colocaron en agua a 100°C, durante 5 minutos y posteriormente a -20°C durante 5 minutos (esto se repitió 2 veces). Después, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 2 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 0.6 ml. Las muestras de DNA se almacenaron a -20°C hasta su uso.

8.4.2 Diseño de oligonucleotidos para PCR

Para poder amplificar el fragmento de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final, se mandaron a sintetizar oligonucleótidos, los cuales fueron previamente diseñados en el laboratorio de Epidemiología de enfermedades infecciosas del CISEI en el Instituto Nacional de Salud Pública, primero comparando las secuencias de genes en el Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con las secuencias más reportadas en la bibliografía para los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M que se pretendió encontrar, después se seleccionaron las secuencias con las que se tenía un más alto porcentaje de similitud y se compararon mediante BLAST del NCBI, para obtener las regiones más conservadas de la secuencias estudiadas y ahí seleccionar la secuencia de nuestros oligos.

8.4.3 Amplificación de los genes *bla*

La presencia de genes *bla* se determinó a partir de la amplificación de un fragmento de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final, empleando oligonucleótidos específicos para los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M. Las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran

en la Tabla 2. La mezcla para cada una de las reacciones de PCR se ajustaron a un volumen final de 25 μ l.

Tabla 2. Oligonucleotidos utilizados en la reacción de PCR.

CLAVE	LONGITUD	SECUENCIA 5´- 3´	Tm (°C)	GEN	TAMAÑO (pb)
SHV - F	22	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TGT A	63.45	SHV	611
SHV - R	20	CGA CCC GAT CGT CCA CCA TC	69.85		
CTX- Muniv - F	23	TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA	65.11	CTX-M	544
CTX- Muniv - R	21	CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT	66.50		
TEM - F	19	CAA CAT TTT CGT GTC GCC C	64.61	TEM	811
TEM - R	19	GCT TAA TCA GTC AGG CAC C	64.61		

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (i-Cycler BIO-RAD®, México), con las siguientes condiciones: Un ciclo a 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos; un ciclo a 72°C durante 3 minutos. Todas las reacciones al finalizar la técnica se colocaron a 4°C hasta su uso.

Los productos amplificados se analizaron por una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en buffer TAE 1X (Tris Base 0.04M, pH8; Ácido acético 1.142mL; EDTA 0.001M pH8), teñidos con SYBR® Green (Invitrogen, USA). La corrida de electroforesis se hizo durante 70 minutos a 120 volts, para finalmente visualizar los geles con un transiluminador de luz UV y detectar la presencia o ausencia de los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M respectivamente.

8.5 Relación clonal

8.5.1 Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es una técnica que permite la separación de moléculas de ADN en gel de agarosa mediante el uso de dos campos eléctricos alternos, con vectores dirigidos el uno al otro en ángulo obtuso [Smith *et al.*, 1990]. PFGE fracciona moléculas de ADN grandes en el intervalo de tamaño de 10 kb a 10 Mb [Cooney, 1992].

Se realizó la tipificación molecular por medio de la técnica de PFGE donde se partió tomando 5 mL de cultivo puro en caldo Luria Bertani (LB), se cosecharon las cepas por centrifugación a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se llevaron a cabo dos lavados con solución PIV (NaCl 1M, Tris 0.01M y Agua), resuspendiéndose en 440 µL de la misma solución.

Después se mezcló con un volumen conocido de agarosa D5 LOW EEO con punto de fusión de 45°C en solución PIV. Con la mezcla que se obtuvo, se fabricaron discos de 20 µL y se mantuvieron a 20°C por 5 minutos, posteriormente se trataron con solución de lisis EC (Tris 1M pH8, NaCl 1M, EDTA 0.5 M pH8, desoxicolato de sodio 0.1%, Brij 58 0.5%, 50 µg/ml de RNAsa A, 10 µg/mL de lisozima) y se incubaron a 37°C por tres horas, después se decantó y se adiciono 1 ml de solución ES (EDTA 0.5 M pH 9, sarcosyl 1%) adicionando 1.0 mg/mL de proteinasa K a una temperatura de 50°C durante 17 horas.

La solución ES se decantó y se lavaron los discos con solución amortiguadora de TE 1X (Tris 1M, pH 7.5, EDTA 0.5M pH 8.0), en agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente, por cinco veces, después se realizó la digestión del DNA con 25 Unidades (U) de enzima Xba I durante 17 horas. Después se separaron los fragmentos de DNA por electroforesis en gel por campos pulsados, en un sistema de electroforesis (Laboratorios BioRad CHEF-DR II) en geles de agarosa al 1% en amortiguador de TBE 0.5X (Tris base 45Mm, ácido bórico 45Mm, EDTA 1mM pH 8.0) a un voltaje de 6 v/cm, con pulsos de linealidad de 1

a 100 segundos por 23 horas. El marcador lambda #340 (New England Biolabs, Ontario, Canadá) se usó como marcador estándar de peso molecular.

Después se tiñó el gel con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL y se observó con luz ultravioleta (UV). Para determinar los tipos clónales se analizaron los perfiles de restricción visual, usando los criterios de Tenover [Tenover *et al.*, 1995].

9 RESULTADOS

9.1 Selección de cepas

De 425 cepas humano identificadas como *E. coli* se seleccionaron un total de 95 cepas que presentaban resistencia a los antibióticos ceftazidima (CAZ) y/o a cefotaxima (CTX) (Figura 6). Para el caso de los cerdos, de las 983 cepas identificadas como *E. coli* se seleccionaron 33 cepas que presentaban resistencia a los antibióticos antes mencionados (Figura 7). En total para este estudio se seleccionaron 144 cepas entre humanos y cerdos.

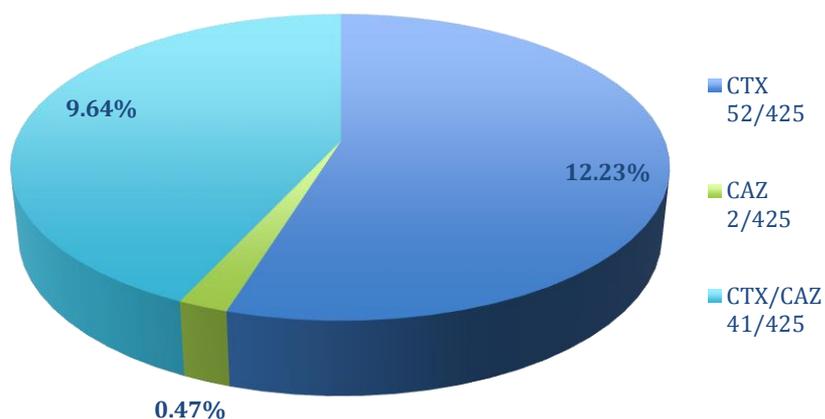


Figura 6. Selección de cepas humano por resistencia.

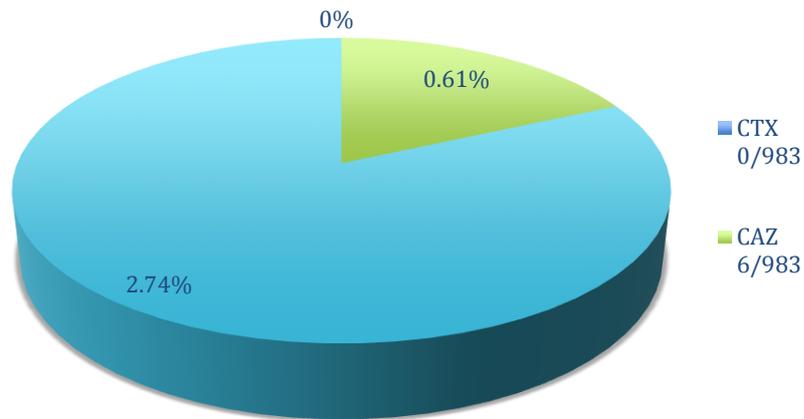


Figura 7. Selección de cepas de cerdo por resistencia.

9.1 Detección de los genes para betalactamasas de espectro extendido (*bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M)

La detección fenotípica de la presencia de BLEE por sinergismo de doble disco se realizó en 33 cepas de *E. coli* aisladas de cerdos y en 95 cepas de humanos, todas resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Como resultado se obtuvo que todas las cepas de *E. coli* de cerdos son productoras de BLEE y de humanos 94/95 (98.94%) son productoras de BLEE.

Además, utilizando la técnica de PCR punto final se amplificaron los genes *bla*CTX-M, *bla*SHV y *bla*TEM (Tabla 4), de los cuales el gen que más predominó tanto en humanos como en cerdos fue *bla*CTX-M con 47/94 (50%) y 14/33 (42.42%) cepas respectivamente. Seguido del gen *bla*TEM presente en 29/94 (30.85%) para humanos y 4/33 (12.12%) para cerdos; el gen *bla*SHV solo se encontró en humanos (4/94, 4.25%) los cuales se muestran en la figura 8 y 9.

Tabla 3. Genes que codifican para BLEEs encontrados según la resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

GENES <i>bla</i>								
ANTIBIOTICO	CTX-M		SHV		TEM		TOTAL	
	CERDO	HUMANO	CERDO	HUMANO	CERDO	HUMANO	CERDO	HUMANO
	CTX	0	12 (23.07%)	0	2 (3.84%)	0	15 (28.84%)	0/0
CAZ	0	0	0	0	2 (33.33%)	0	2/6	0/2
CTX/CAZ	13 (48.14%)	35 (85.36%)	0	2 (4.87%)	2 (7.40%)	14 (34.14%)	15/27	41/41
TOTAL	13	47	0	4	4	29	17/33	80/94

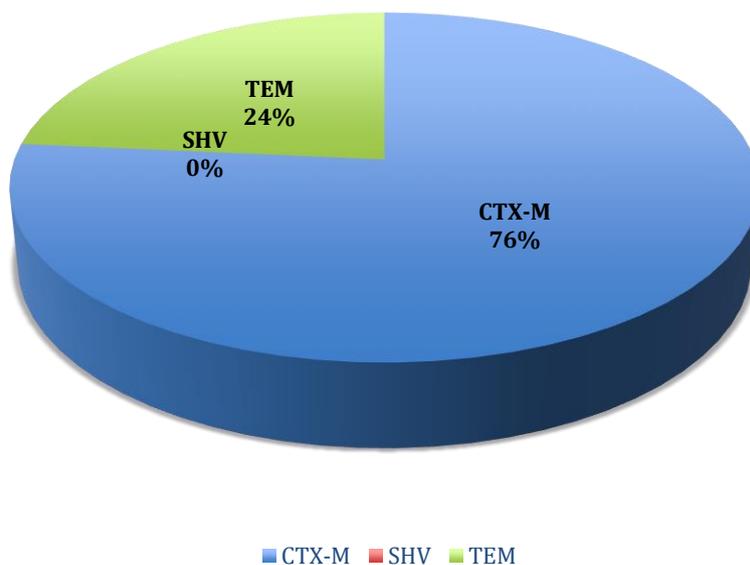


Figura 8. Porcentaje de BLEEs encontradas en cepas de cerdo.

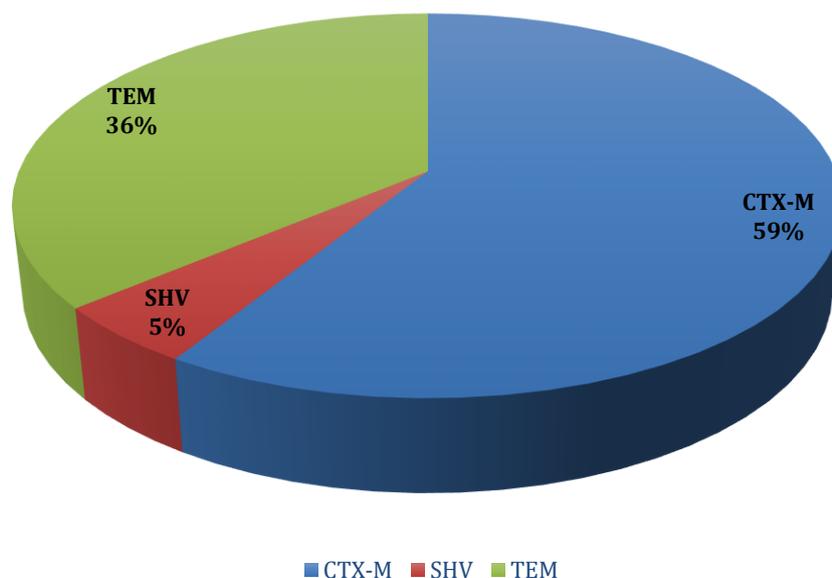


Figura 9. Porcentaje de BLEEs encontradas en cepas de humano.

9.2 Análisis molecular por electroforesis en gel de pampo Pulsado (PFGE)

En el presente trabajo se analizaron por PFGE un total 64 cepas de *E. coli*, patógenas y comensales MDR y no MDR aisladas de heces de humano (41) y de cerdo (23). Los resultados de PFGE mostraron 64 pulsotipos diferentes, de los cuales 41 pulsotipos provienen de cepas de *E. coli* de humano, en su mayoría comensales (33/41, 80.48%) en las que se encontraron cepas MDR (32/33, 96.96%) y cepas no MDR (1/33, 3.03%). Mientras que a las cepas patógenas les corresponden 8 pulsotipos (19.51%), de los cuales el 87.5% (7/8) de las cepas son MDR y 12.5% no MDR (1/8). Del total de los pulsotipos encontrados, destacan 3 clonas mayoritarias designadas como clona R, W y 11, que incluyen dos cepas con un mismo patrón respectivamente. Además, la mayoría de las cepas de *E. coli* de humanos muestran una clara heterogeneidad, lo que indica una diversidad de cepas en la población estudiada.

El resto de los pulsotipos (23/64, 35.93%), corresponden a las cepas de *E. coli* aisladas de cerdos. Todas son comensales y MDR y se puede observar 3 clonas designadas como clona C, con 3 cepas; dos de ellas idénticas y una como un subtipo, y las clonas U y 2C, cada una con dos cepas casi idénticas. El resto de pulsotipos muestran una completa heterogeneidad entre las cepas.

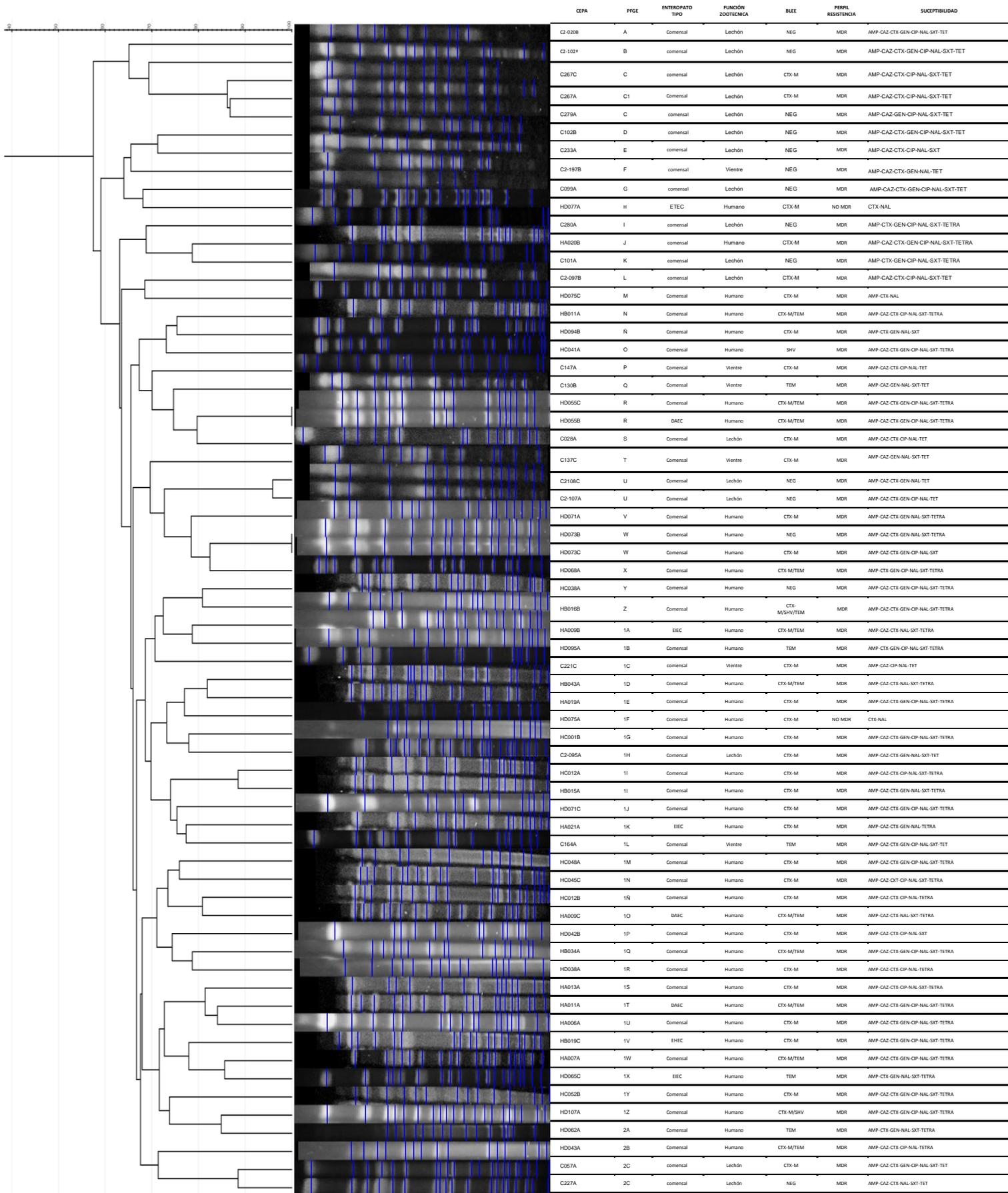


Figura 10. Dendrograma filogenético según el bandeo obtenido por PFGE

10 DISCUSIÓN

Las cepas de *E. coli* aisladas de humano y de cerdo analizadas en este estudio mostraron una alta resistencia a cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftazidima, mostrando una mayor selección de cepas de humano resistentes a cefotaxima seguido de ceftazidima, al igual que en cerdos. Los resultados obtenidos en este estudio marcan una diferencia con lo reportado en la literatura, ya que, en Nigeria, Corea y Canadá no se reportan cepas de *E. coli* resistentes a CAZ y CTX [Varga *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014].

La detección de BLEE en las cepas seleccionadas por resistencia a CTX y/o CAZ en este estudio, muestra que la mayoría de cepas son productoras de BLEE del 98.95 al 100% de las cepas de humano y cerdo respectivamente. Similar a lo reportado en un estudio en Vietnam donde se reportan que 66 de 69 (95.65%) cepas de humano y cerdo son productoras de BLEE [Dang *et al.*, 2018]. Además muestran hallazgos del gen *bla*CTX-M en el 68.5% de los aislamientos de humanos y 66.7% en cerdos. Estos resultados son similares a lo reportado en nuestro estudio donde se detectó que el gen *bla*CTX-M está presente en 14/33 (42.42%) cepas de *E. coli* aisladas de cerdos y en 47/94 (50%) aisladas de humanos. Otros estudios, en México, muestran hallazgos de BLEEs tipo SHV-5 en 2/14 (14.28%) cepas de *E. coli* provenientes de aislamientos clínicos [Garza *et al.*, 2007]. En nuestro caso, reportamos la presencia del gen *bla*SHV en 4/94 (4.25%) cepas de *E. coli* de humano indicando que este gen no es muy común o su frecuencia es baja entre la comunidad estudiada. En cerdos no se encontró la presencia de este gen. La presencia del gen *bla*TEM en los aislamientos de *E. coli* de humanos fue de 29/94 (30.85%), una frecuencia relativamente baja si se compara con un estudio realizado en dos hospitales de Perú donde se reporta una frecuencia de 60.61% (40/66), mientras que en cerdos tuvimos una frecuencia del gen *bla*TEM de 12.12% (4/33), que al igual que la frecuencia en humanos es baja comparada con un estudio realizado en una granja porcícola en Colombia donde su frecuencia es de 30.55% (11/36).

Estos resultados nos evidencian que uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia en el entorno hospitalario y en los casos de brotes epidemiológicos, así como en las granjas de producción animal es la presencia del gen *bla*CTX-M, el cual se puede difundir a la población por contacto directo o a través de la cadena alimenticia.

Para evaluar la clonalidad de las cepas de *E. coli* en este estudio se analizaron por PFGE 64 cepas. De las cuales 41 provenían de humanos donde se observaron tres clonas mayoritarias, la clona R, que incluye dos cepas con un coeficiente de similitud de 100%, ambas cepas son MDR y presentaron el gen *bla*CTX-M / *bla*TEM, una es comensal y la otra tiene el patotipo DAEC, la clona W, con dos subtipos que presentan su coeficiente de similitud de 100%, ambas son MDR, y presentan el gen *bla*CTX-M y son comensales y la clona 11 donde ambas cepas son comensales, MDR, y presentan el gen *bla*CTX-M. Comparado con un estudio realizado en Argentina [Leotta *et al.*, 2008] donde se caracterizaron cepas de *E. coli* provenientes de humanos se encontraron 10 clonas y 36 cepas con patrones únicos, similar a los hallazgos de este estudio pues, las clonas representan un menor número comparados con las cepas de patrones únicos. De las 23 cepas que se evaluaron de cerdos, se encontró que había 3 clonas, una denominada U, con dos cepas con un coeficiente de similitud del 98%, ambas comensales, MDR y sin ningún gen de resistencia *bla*, la clona 2C, también con dos cepas de mismo coeficiente de similitud que la anterior, ambas comensales y MDR, con la diferencia de que una presentaba el gen *bla*CTX-M, y la clona C, donde hay tres cepas dos de ellas idénticas y una con el 98% de similitud entre estas, todas MDR, comensales y presentaron el gen *bla*CTX-M. En un estudio realizado en Eslovaquia, se mostró que la mayoría de los aislados provenientes de cerdos presentaba pulsotipos diferentes [Vu-Khac *et al.*, 2007], al igual que lo observado en este estudio.

11 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- El hallazgo de resistencias elevadas a cefalosporinas de tercera generación en cerdos puede indicar su diseminación fuera del ambiente hospitalario, llevando así un intercambio entre los humanos y los cerdos, pero las evidencias aún son escasas.
- La cadena alimenticia es un posible vínculo de transferencia de genes de resistencia al humano, por lo que el cerdo puede considerarse como un reservorio de las cepas de *E. coli* portadoras de genes de resistencia.
- La presencia de BLEES, principalmente CTX-M, en humanos y cerdos nos muestra el elevado uso de cefalosporinas de tercera generación en el área de veterinaria y clínica.
- Los patrones de PFGE fueron diferentes entre humanos y cerdos concluyendo que existe una gran diversidad genética en los aislamientos de *E. coli* circulantes en nuestra región.

12 PERSPECTIVAS

La presencia de BLEEs en las cepas de *E. coli* analizadas enfatiza la necesidad de profundizar en estudios sobre la caracterización molecular de los mecanismos de resistencia y confirmar su posible propagación mediante ensayos de conjugación.

Además, sería interesante identificar a que grupo específico de la familia de BLEEs pertenece cada una de las identificadas y tener así un estudio más centrado y específico. Logrando con eso tener mayor información para tratar el problema.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, D. (2016). E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Médica Sur*, 22(2), 57-63.
- Aliaga, R. R. (2002). *Caracterización de las beta-lactamasas de espectro extendido y cefamicinasas en enterobacterias aisladas entre 1997 y 1999 en Barcelona*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331.
- Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Recuperado de <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (Consulta: 08 de abril de 2019]
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Mejia-Miranda, I., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Mosqueda-García, D., & Bacterial Resistance Consortium. (2017). ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 243-246.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
- Carroll, K., Morse S., Mietzner T, Miller, S., (2017). Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 27ª Edición. Estados Unidos: Mcgrawhill.
- Cicuta, M. E., Parma, A. E., Viñas, M. R., Sanz, M. E., Boehringer, S. I., Roibón, W. R., & Vena, M. M. (2016). Factores de Virulencia de *Escherichia coli* aisladas de porcinos en Argentina. *Revista Veterinaria*, 10(1 y 2), 11-13.
- Collignon, P. (2009). Editorial commentary: resistant *Escherichia coli* - we are what we eat. *Clinical infectious diseases*, 49(2), 202-204.
- Colquechagua, Al. F, Sevilla, A. C, Gonzales, E. E. (2015) Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1):26-32.

- Cooney, C. A. (1992). Separation and Size Determination of DNA over a 10–, 200 kbp Range. In *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (pp. 31-37). Humana Press.
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., ... & Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerging infectious diseases*, 14(2), 195.
- CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S25; twenty-fifth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dang, S. T., Bortolaia, V., Tran, N. T., Le, H. Q., & Dalsgaard, A. (2018). Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from farm workers and pigs in northern Vietnam. *Tropical Medicine & International Health*, 23(4), 415-424.
- Datos recientes revelan los altos niveles de resistencias a los antibióticos en todo el mundo. Recuperado de <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/> (Consulta: 11 de abril de 2019).
- Escudero, E., Vinue, L., Teshager, T., Torres, C., & Moreno, M. A. (2010). Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Research in veterinary science*, 88(1), 83-87.
- Estrada, T., Lopez, C., Thompson, R., Abonce, M., Lopez, D., Santos, J. I., ... & Long, K. Z. (2009). Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, 47(1), 93-98.
- Galindo, M. (2018). Caracterización molecular y patrón de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido en infección del tracto urinario adquirida en la comunidad. *Revista chilena de infectología*, 35(1), 29-35.
- García Castellanos, T., Castillo Marshal, A., & Salazar Rodríguez, D. (2014). Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(1), 129-135.
- Garza-Ramos, U., Martínez-Romero, E., & Silva-Sánchez, J. (2007). beta-Lactamasas de espectro extendido (BLEE) tipo SHV están codificadas en plásmidos

- relacionados en aislamientos clínicos de enterobacterias en México. *Salud Pública de México*, 49(6), 415-421.
- Gómez, J., García-Vázquez, E., & Hernández-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 1-9.
- Gudiol, F., & Marín, M. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), 42-55.
- Hunter, P. A., Dawson, S., French, G. L., Goossens, H., Hawkey, P. M., Kuijper, E. J., Nathwani, D., Taylor, D. J., Teale, C. J., Warren, R. E., Wilcox, M. H., Woodford, N., Wulf, M. W., & Piddock, L. J. (2010). Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(Suppl. 1), i3–i17.
- Instituto Nacional De Salud Pública. [INSP] (Agosto, 2020) [<https://www.insp.mx/avisos/4311-prescripcion-inadecuada-antibioticos.html>]
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., ... & Greko, C. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet infectious diseases*, 13(12), 1057-1098.
- Lee, M., Shin, E., & Lee, Y. (2014). Antimicrobial resistance and integron profiles in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs. *Foodborne pathogens and disease*, 11(12), 988-997.
- Leotta, G. A., Miliwebsky, E. S., Chinen, I., Espinosa, E. M., Azzopardi, K., Tennant, S. M., ... & Rivas, M. (2008). Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *Bmc Microbiology*, 8(1), 46.
- Levy, S. B., Fitzgerald, G. B., & Macone, A. B. (1976). Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*, 260(5546), 40-42.
- Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. *Frontiers in microbiology*, 7, 1374.
- Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., and Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 165–174.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Barrachina, C., Berlanga, M., Buckley D. H., Gonzalo, M., Diaz, C., Stahl D. A., y Ruiz Berraquero, F. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. Pearson Educación.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Mandell, G. L., Douglas Jr, R. G., & Bennett, J. E. (1979). Principles and practice of infectious diseases. Vols 1 and 2. *Principles and practice of infectious diseases. Vols 1 and 2. Inc., New York, NY*.
- Marrero, C. M., Mora, M., Hernández, R. E., Báez, M., García, T., & Espinosa, I. (2017). Identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia Matanzas. *Revista de Salud Animal*, 39(3).
- Mathew, A. G., Cissell, R., & Liamthong, S. (2007). Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne pathogens and disease*, 4(2), 115-133.
- Mella, S., Zemelman, C., Bello, H., Dominguez, M., Gonzalez, G., & Zemelman, R. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Revista chilena de infectología*, 18(1), 7-19.
- Molina, L. J. & Eslava, C. C. A. (2015). Recursos en Bacteriología. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html> (Consulta: 06 de abril de 2019).
- Morejón García, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista cubana de medicina*, 52(4), 272-280.
- Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192.
- Paredes O. R, Mendoza O. S, Silva S. J, Rodriguez N. E, Laca D. J, Tinoco C. P, Petersen L, Lopez P, Reyna F. F, Alcantar C. D, Garza R. U, Garza G. E. (2013). Characterization of Enterobacteriaceae isolates obtained from a tertiary care

hospital in Mexico, which produces extended-spectrum betalactamase. *Microb Drug Resist* 19:378–383. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2012.0263>

Organización mundial de la salud (OMS). Febrero, 2014

Paredes, D. O., & Zurita, J. (2013). Integrones: plataformas bacterianas de recombinación genética y su influencia en la resistencia bacteriana. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*, 34(1), 167-185.

Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657-686.

Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet infectious diseases*, 8(3), 159-166.

Poirel, L., Héritier, C., Podglajen, I., Sougakoff, W., Gutmann, L., & Nordmann, P. (2003). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(2), 755-758.

Poirel, L., Naas, T., Le Thomas, I., Karim, A., Bingen, E., & Nordmann, P. (2001). CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(12), 3355-3361.

Prescripción excesiva de antibióticos y mejores prácticas para evitarla. Recuperado de <https://www.insp.mx/avisos/4311-prescripcion-inadecuada-antibioticos.html> (Consulta: 14 de abril de 2019).

Rivera J. M., Rodríguez U. C., Flores C. R., Serquén L. L., & Arce G. Z. (2015). Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32, 752-755.

Rocha, R., Ruiz, E., Romero, S., Lozano, P., Somalo, S., Palacios, J. M., Caballero P. y Torres, C. (2009). Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant qepA1 in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(1), 169-171.

Romero Caballero, R. (2013). Microbiología y parasitología humana bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial Médica Panamericana. 3a Edición, pp. 741-749.

- Silva Sánchez, J. (2017). β -lactamasas como principal mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos en bacterias causantes de infecciones hospitalarias. *Mens. Bioquim.* 41(2017): 76 - 82
- Smith, C. L., & Condemine, G. (1990). New approaches for physical mapping of small genomes. *Journal of bacteriology*, 172(3), 1167.
- Soto Varela, Z., Pérez Lavalle, L., & Estrada Alvarado, D. (2016). *Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia*. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
- Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri. Recuperado de <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf> (Consulta: 06 de abril de 2019)
- Tafur, J., Torres, J., & Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*. [Internet]. [Citado 2015 ene-ro 22]; 12 (3): 227-232.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233.
- Thompson, R. L. (1987). Cephalosporin, carbapenem, and monobactam antibiotics. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 62, No. 9, pp. 821-834). Elsevier.
- Torres, C. (2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. *Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza*. Zaragoza: Cometa SA, 18-27.
- Tortora G. J, Funke B.R. y Case, C. L. (2007). Introducción a la microbiología. Ed: Médica Panamericana. Buenos aires, Argentina.
- Valenza, G., Nickel, S., Pfeifer, Y., Eller, C., Krupa, E., Lehner-Reindl, V., & Höller, C. (2014). Extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli as intestinal colonizers in the German community. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(2), 1228-1230.
- Varga, C., Rajic, A., McFall, M. E., Avery, B. P., Reid-Smith, R. J., Deckert, A., Checkley L. & McEwen, S. A. (2008). Antimicrobial resistance in generic Escherichia coli isolated from swine fecal samples in 90 Alberta finishing farms. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72(2), 175.

- Varela, Y., Millán, B., & Araque, M. (2017). Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud. *Biomédica*, 37(2), 209-217.
- Villegas, M. V., Kattan, J. N., Quinteros, M. G., & Casellas, J. M. (2008). Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 154-158.
- Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., Mora, A., Lopez, C., Gonzalez E. A., & Blanco, J. (2007). Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *The Veterinary Journal*, 174(1), 176-187.
- Weese, J. S., Giguère, S., Guardabassi, L., Morley, P. S., Papich, M., Ricciuto, D. R., & Sykes, J. E. (2015). ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(2), 487-498.
- Yuan, M., Aucken, H., Hall, L. M., Pitt, T. L., & Livermore, D. M. (1998). Epidemiological typing of klebsiellae with extended-spectrum beta-lactamases from European intensive care units. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 41(5), 527-539.