



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**



**FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE
Escherichia coli RESISTENTES A BETALACTAMICOS
AISLADA DE UNA INTERFASE SALUD HUMANA-ANIMAL**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN MEDICINA MOLECULAR**

QUE PRESENTA:

BIOL. JACKELINE CERÓN LÓPEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ELSA MARÍA TAMAYO LEGORRETA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER**



CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2025

*"El éxito no es más que un número infinito de pequeños
esfuerzos repetidos constantemente"*

- Robert Collie

I. DEDICATORIAS

A mis padres:

María E. López Jiménez y Julio Cerón Ángel

De todo corazón, quiero agradecerles por ser una parte esencial de este logro que hoy celebro. Este éxito no es solo mío, sino también suyo, porque todo lo que he alcanzado lo debo a su apoyo y cariño. Gracias por estar siempre a mi lado y ser mi fuerza en cada paso de este camino. Los quiero mucho y siempre los llevaré conmigo.

A mis hermanos:

Lizbeth Cerón López

Gracias a Dios y a la vida por regalarme no solo una hermana, sino también una amiga incondicional. A ti, Lizzy, mi agradecimiento eterno por estar siempre a mi lado, por brindarme tu apoyo en todas las formas posibles, pero, sobre todo durante todo este proceso, tanto en esta etapa profesional como en la elaboración de este trabajo. Gracias por ser siempre la mejor hermana que podría haber pedido. Te quiero más de lo que las palabras pueden expresar.

Erick Geovani Cerón López

A ti, hermano, por ser parte de este logro tan importante para mí. Sé que tal vez aún no comprendas completamente el significado de este momento, ni lo que representa para mí el poder dedicarte esta tesis. Sin embargo, quiero que sepas que tu presencia ha sido importante en cada paso de este camino. Gracias por estar a mi lado, aunque en ocasiones no lo digamos con palabras, siento tu apoyo en todo lo que hago.

Los amo hermanos.

Nina y Dolly: Gracias por ser fieles compañeras en cada momento, por ser testigos silenciosos de mis desvelos, lágrimas y esas largas horas de lectura y escritura. Por formar parte tan importante de mi familia y, sobre todo, por estar a mi lado en esta etapa de mi vida. Su presencia me ha dado consuelo, compañía y alegría cuando más lo necesitaba.

Mis compañeros:

A mis compañeros del laboratorio, Ale y Nay, por hacer que la estancia en el laboratorio fuera mucho más amena y llevadera. A mis compañeros del grupo de resistencia a los antimicrobianos, Nely, Naye, Jona, Luis, Elena, Migue, Mago, Adri y Edgar, gracias por su apoyo, por compartir sus conocimientos y observaciones en cada presentación.

Especialmente a ti, Jonathan, te agradezco infinitamente por tus consejos y por los conocimientos compartidos conmigo. Sin duda, te admiro y te respeto.

A los Dres. Ulises, Nadia y Alejandro Alvarado, gracias por sus valiosos consejos, aportaciones y observaciones que enriquecieron este trabajo. También quiero expresar mi agradecimiento por la oportunidad de formar parte de su equipo, una experiencia que me ha permitido crecer tanto profesional como personalmente.

II. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), por proporcionar la infraestructura necesaria para llevar a cabo este proyecto de tesis. A todo el personal que mantiene en funcionamiento los laboratorios, y en particular al laboratorio de Epidemiología en Enfermedades Infecciosas, el cual se encuentra bajo la dirección de la Dra. Celia M. Alpuche Aranda y la Dra. Elsa M. Tamayo Legorreta quienes me brindaron la oportunidad de pertenecer al laboratorio y realizar el presente trabajo de investigación, trabajo que hoy puedo decir esta culminado.

A mi directora de tesis, la Dra. Elsa M. Tamayo Legorreta, le expreso mi más sincero agradecimiento por brindarme la oportunidad y la confianza para llevar a cabo este proyecto bajo su tutela. Su apoyo incondicional, el tiempo y dedicación que invirtió en cada etapa de este trabajo, así como los conocimientos que generosamente compartió, fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Aprecio profundamente los valiosos consejos (personales y profesionales) que me ofreció en todo momento, y, sobre todo, valoro enormemente su acompañamiento constante y su orientación durante mis seminarios de investigación, los cuales enriquecieron significativamente mi proceso de aprendizaje.

A la Dra. Celia M. Alpuche Aranda, le agradezco profundamente por el tiempo y el apoyo que me brindó a lo largo de cada uno de mis seminarios de investigación. Su orientación fue clave en el proceso de desarrollo de este trabajo y su experiencia contribuyó de manera fundamental a la evolución de este trabajo.

Al Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer, co-director de este trabajo, le agradezco el aceptar este compromiso, el rol de co-dirección y por la confianza que ha depositado en mí a lo largo de todo este proceso. Su apoyo y disposición fueron fundamentales para el avance y culminación del presente trabajo, así como de la etapa académica.

Agradezco a mi comité evaluador, compuesto por la Dra. Celia M. Alpuche Aranda, el Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz y la Dra. Vera Lucia Petricevich, por su tiempo y dedicación al revisar y evaluar este trabajo. Gracias por su valiosa contribución.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de la maestría otorgada para la culminación de los estudios de posgrado y por el apoyo económico otorgado al proyecto CF-2023- I-2223 “Caracterización del resistoma y viruloma basada en análisis genómicos de *Escherichia coli* aislada de una interfase salud humana-animal”, a través de la convocatoria Ciencia de Frontera 2023-Conahcyt.

III. ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	3
4. MARCO TEÓRICO	4
4.1 Generalidades de Enterobacterias	4
4.2 <i>Escherichia coli</i>	4
4.2.1 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	6
4.2.1.1 Mecanismo de patogenicidad	7
4.2.2 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	7
4.2.2.1 Mecanismo de patogenicidad	7
4.2.3 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	8
4.2.3.1 Mecanismo de patogenicidad	8
4.2.4 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	8
4.2.4.1 Mecanismo de patogenicidad	9
4.2.5 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	9
4.2.5.1 Mecanismo de patogenicidad	10
4.2.6 <i>E. coli</i> adherente difusa (DAEC)	10
4.2.6.1 Mecanismo de patogenicidad	10
4.3 Antibióticos	11
4.3.1 Clasificación de acuerdo con su espectro de acción	11
4.3.2 Clasificación de acuerdo con su mecanismo de acción	12
4.3.3 Clasificación de acuerdo con su composición química	13
4.4 Resistencia Bacteriana	14
4.4.1 Mecanismos de resistencia bacteriana	15
4.5 Epidemiología de <i>Escherichia coli</i>	16

4.5.1 Epidemiología en Humanos	16
4.5.2 Epidemiología en porcinos	17
5. ANTECEDENTES	18
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
7. JUSTIFICACIÓN	19
8. HIPÓTESIS	20
9. OBJETIVOS	20
9.1 Objetivo General	20
9.2 Objetivos Específicos	20
10 MATERIAL Y MÉTODOS	21
10.1 Esquema de Trabajo	21
10.2 Estudio Experimental	22
10.2.1 Selección de cepas	22
10.2.2 Prueba confirmatoria de doble disco para determinar BLEE	23
10.2.3 Extracción de DNA	23
10.2.3.1 Extracción de DNA genómico	23
10.2.3.2 Extracción de DNA plasmídico	24
10.2.4 Amplificación de genes de resistencia para BLEE	24
10.2.5 Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE)	25
10.2.6 Identificación de filogrupos en <i>Escherichia coli</i>	26
10.2.7 Determinación del perfil de plásmidos de <i>Escherichia coli</i>	28
11. RESULTADOS	29
11.1 Selección de cepas	29
11.2 Prevalencia de BLEE y distribución de genes de resistencia	30
11.3 Relación clonal entre cepas de <i>Escherichia coli</i> por PFGE	31
11.4 Filogrupos en <i>Escherichia coli</i> de origen humano y porcino	33
11.5 Determinación del perfil plasmídico	35

12. DISCUSIÓN	37
13. CONCLUSIÓN	43
14. REFERENCIAS	43
14.1 Referencias bibliográficas	44
14.2 Fuentes electrónicas	50

IV. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de distintos antibióticos	12
Figura 1. Mecanismos de resistencia bacteriana	16
Figura 2. Esquema general de trabajo	21
Figura 3. Confirmación de la resistencia a cefalosporinas de 3 ^{ra} generación.....	22
Figura 4. Distribución de la resistencia a ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX) en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de origen humano	29
Figura 5. Distribución de la resistencia a ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX) en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de origen porcino	30
Figura 6. Prevalencia de BLEE y distribución de genes de resistencia en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de humanos y cerdos	31
Figura 7. Dendograma de la relación clonal de cepas representativas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de cerdos (A) y humanos (B)	32
Figura 8. Distribución de filogrupos en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de origen humano	34
Figura 9. Distribución de filogrupos en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de origen porcino	34
Figura 11. Distribución del perfil plasmídico en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de humanos	35
Figura 12. Distribución del perfil plasmídico en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de cerdos	36

V. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de <i>Escherichia coli</i> patógena entérica en humanos	5
Tabla 2. Principales características de <i>Escherichia coli</i> patógena entérica en cerdos	6
Tabla 3. Clasificación de los antibióticos de acuerdo con su composición	13
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de resistencia, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV y <i>bla</i> TEM por la técnica de PCR punto final	25
Tabla 5. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV y <i>bla</i> TEM	25
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i> por PCR punto final	27
Tabla 7. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i>	27
Tabla 8. Genotipos y Asignación de los filogrupos para <i>Escherichia coli</i>	27

1. RESUMEN

Escherichia coli (*E. coli*) es el principal patógeno causante de diarrea y edema en lechones lactantes y posdestetados. Existe una preocupación global de salud pública debido a un número creciente de infecciones humanas asociadas con *E. coli* patógena y resistente a múltiples fármacos transmitida por la cadena alimentaria y/o el medio ambiente. Monitorear los aislamientos de *E. coli* patógena y su resistencia a los antimicrobianos es crucial para el manejo sostenible de enfermedades tanto en el ganado como en la medicina humana. De una base de datos se seleccionaron 88 cepas de *E. coli* resistentes a ceftazidima y cefotaxima de origen porcino (25/88) y humano (63/88). La resistencia a betalactámicos se confirmó mediante concentración mínima inhibitoria usando la técnica de microdilución en caldo. Los genes de resistencia a betalactámicos (*bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM), de factores de virulencia (*eae*, *stx1*, *stx2*, *elt*, *est*, *ipaH*, *aat*, *daa*) y la filotipificación por el método de Clermont se analizaron por PCR punto final. La relación clonal se determinó por electroforesis en campos pulsados. La extracción de DNA plasmídico se realizó por el método de Kieser. Se confirmó la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y un fenotipo de BLEE en los 88 aislamientos de *E. coli*. Un fenotipo de multidrogo resistencia se mostró en 63 aislamientos de origen humano y 25 de origen porcino. Sesenta y tres cepas de *E. coli* de humanos mostraron al menos un marcador de patogenicidad siendo los patotipos más comunes DAEC (9.1%) y EIEC (4.55%). En cerdos, no se aisló ningún patotipo de *E. coli*, es decir, las 25 cepas fueron comensales. Las clases de genes de betalactamasa más predominantes fueron *bla*CTX-M (78.40%) y *bla*TEM (35.22%). La filotipificación dividió todos los aislamientos en cuatro grupos. En la mayoría de los aislamientos, el filogrupo A (46.59%) y filogrupo D (38.63%) fueron los más dominantes, mientras que el resto pertenecía a B1 (9.09%) y B2 (5.68%). El filogrupo A corresponde a cepas de *E. coli* comensales mientras que el filogrupo D es un indicador de contaminación fecal humana y se asocian a *E. coli* patógena. El análisis de campos pulsados comprobó que existe una diversidad genética entre las cepas de cerdos y humanos mostrando que no están clonalmente relacionadas. La clonotipificación en cerdos reveló la relación clonal de 2 aislamientos (L) y 3 aislamientos (M). En humanos, la relación clonal de 2 aislamientos (M), 4 aislamientos (N), 2 aislamientos (Q) y 3 aislamientos (T). El análisis del perfil de plásmidos muestra que los aislamientos de *E. coli* de origen porcino y humano comparten un plásmido de aproximadamente 66 kb. Este estudio resalta la importancia de monitorear la resistencia a los antibióticos y la patogenicidad de aislamientos de *E. coli* porcinos. La presencia de BLEE en animales de consumo potencialmente puede seleccionar bacterias resistentes que posteriormente logren transferirse de forma horizontal al consumidor (humano) a través del contacto directo y por la cadena alimenticia. La presencia de clones zoonóticas patógenas resistentes a múltiples antibióticos, así como aquellas que son resistentes a antibióticos de importancia crítica para los humanos, puede representar un riesgo para la salud pública. Es fundamental abordar este problema de manera integral mediante prácticas de saneamiento y uso responsable de antibióticos en granjas porcinas para prevenir infecciones, así como el mantenimiento y la dispersión de los aislamientos causales.

Palabras clave: *Escherichia coli*, resistencia antimicrobiana, cerdos, humanos

2. INTRODUCCIÓN

Las cefalosporinas de tercera generación (C3G), como la ceftazidima (CAZ) y la cefotaxima (CTX), son antibióticos β -lactámicos ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas graves. Desde su introducción en la década de 1980, han sido esenciales para el manejo clínico tanto en medicina humana como veterinaria. Sin embargo, su efectividad ha disminuido debido al aumento de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas capaces de inactivar estos antibióticos y conferir resistencia.

En medicina veterinaria, CAZ y CTX han sido empleados para tratar y prevenir enfermedades en animales destinados al consumo humano, e incluso como promotores de crecimiento. Estas prácticas, a menudo poco reguladas, han favorecido la selección y diseminación de cepas resistentes, especialmente en entornos donde la cercanía entre humanos y animales incrementa el riesgo de transferencia de genes de resistencia [Mosquito *et al.*, 2011].

La adquisición de BLEE por *Escherichia coli* en humanos y animales representa un mecanismo crítico de resistencia, ya que estas cepas multirresistentes (MDR) pueden incorporar genes adicionales mediante elementos genéticos móviles, lo que facilita su diseminación y dificulta su tratamiento. En casos extremos, alcanzan resistencia a todos los antibióticos disponibles (pandrogoresistencia, PDR), asociándose con mayor mortalidad, hospitalizaciones prolongadas y altos costos en salud pública [Mosquito *et al.*, 2011].

En el estado de Morelos, México, la información sobre la resistencia a C3G en *E. coli* es limitada, a pesar de que en regiones cercanas se ha documentado su presencia en ambientes humanos, animales y ambientales. Ante la falta de datos actualizados, resulta prioritario generar evidencia científica que permita comprender la dinámica de la resistencia antimicrobiana en la interfase salud humana-animal. En este estudio, se buscaron aislamientos de *E. coli* MDR con resistencia a CAZ y CTX de origen porcino y humano, con el objetivo de describir sus características moleculares y los mecanismos de resistencia involucrados.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia antimicrobiana (RAM) representa una amenaza creciente para la salud pública global, particularmente cuando afecta a antibióticos de amplio uso como las cefalosporinas de tercera generación. Entre los mecanismos más relevantes asociados a esta resistencia se encuentran las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), cuya diseminación ha sido ampliamente documentada en enterobacterias como *Escherichia coli*. En particular, las cepas multirresistentes (MDR) productoras de BLEE se han consolidado como una causa importante de infecciones difíciles de tratar, tanto en ambientes hospitalarios como comunitarios.

En México, el uso de antimicrobianos en la producción animal continúa siendo una práctica común, muchas veces sin una regulación efectiva ni monitoreo de su impacto microbiológico. Esta situación favorece la aparición de cepas resistentes en animales destinados al consumo humano, como los cerdos, generando un escenario de riesgo en la interfase salud humana-animal. La falta de información actualizada sobre la caracterización molecular de *E. coli* resistentes a CAZ y CTX en esta interfase impide dimensionar adecuadamente la magnitud del problema y limita el desarrollo de estrategias de vigilancia y control.

En el estado de Morelos, la evidencia científica sobre la presencia y el comportamiento genético de *E. coli* productora de BLEE es escasa, particularmente en contextos donde la cercanía entre humanos y animales favorece la transferencia potencial de genes de resistencia. Esta ausencia de datos locales limita la comprensión del papel que juegan los reservorios animales en la diseminación de cepas resistentes y obstaculiza la formulación de políticas sanitarias efectivas. Por tanto, es fundamental generar evidencia científica que permita caracterizar molecularmente estas cepas y comprender su distribución, mecanismos de resistencia y relaciones clonales entre hospedadores humanos y animales.

4. MARCO TEORICO

4.1 Generalidades de Enterobacterias

Las enterobacterias son un grupo de microorganismos generalmente con forma de bastón, gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, pueden presentar flagelo para su locomoción o ser inmóviles, no forman esporas, algunos de los microorganismos que se encuentran en este grupo son los del género *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* entre otras, que se caracterizan principalmente por causar infecciones gastrointestinales [Puerta-García *et al.*, 2010].

4.2 *Escherichia coli*

E. coli es un microorganismo gram negativo, pueden ser móvil o inmóvil, tienen la capacidad de fermentar lactosa y de producir indol, además es perteneciente al grupo de las enterobacterias, generalmente se localiza y es parte importante del tracto intestinal del ser humano y animales saludables. Sin embargo, existen algunos tipos de *E. coli* que pueden causar enfermedades gastrointestinales, esta bacteria es transmitida al humano por contacto con personas y/o animales enfermos (destinados a la producción de alimentos) principalmente por la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas algunos de estos alimentos como productos de cárnicos y/o de origen animal (carne picada cruda o poco cocida, leche cruda) no obstante también puede encontrarse en alimentos de origen vegetal [OMS, 2018; Puerta-García *et al.*, 2010; CDC, 2014].

Dentro del grupo de las *E. coli* patógenas entéricas causantes de infecciones gastrointestinales tanto en humanos como en cerdos existen seis patotipos, que se clasifican de acuerdo con su mecanismo de patogenicidad: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC) (Tabla 1 y 2) [CDC, 2014; Rodríguez-Angeles, 2002].

Tabla 9. Principales características de *Escherichia coli* patógena entérica en humanos [Rodríguez-Angeles, 2002].

PATOTIPO	CUADRO CLÍNICO	EPIDEMIOLOGÍA	GENES DE VIRULENCIA
EPEC	Diarrea acuosa, febrícula, dolor abdominal y vomito	Niños menores de 6 meses hasta 2 años	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Gen eae: adhesinas intimina ❖ Plásmido eaf ❖ Adherencia y Eliminación (A/E)
ETEC	Diarrea aguda acuosa y diarrea del viajero	Niños menores de 2 años	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Toxinas: St y Lt ❖ Factor de colonización de antígenos (CFA)
EHEC	Enteritis hemorrágica, Síndrome Uremico Hemolitico, fiebre, dolor abdominal y vomito	Todas las edades	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Toxinas: Stx ❖ Adherencia y Eliminación (A/E) ❖ Intimina (eae) ❖ Plásmido de virulencia pO157
EIEC	Diarrea con moco y sangre	Todas las edades	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Plásmido (pINV) ❖ proteínas: <i>ipa</i>
DAEC	Diarrea acuosa y sin sangre	Niños de 1 a 5 años	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Genes: <i>afa</i>, <i>dra</i>, <i>daa</i> codifica para adhesinas. ❖ Gen: <i>daaC</i> ❖ Fimbria F1845
EAEC	Diarrea acuosa con moco y sin sangre	Niños recién nacidos hasta dos años	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Plásmido <i>pAA</i> codifica para fimbrias <i>AAF</i> ❖ Gen <i>aggR</i> regula factores de transcripción ❖ Gen <i>astA</i> codifica para toxinas entero agregativas (<i>St</i>, <i>Sl</i>) ❖ Gen <i>aap</i> codifica para dispersina ❖ Fimbrias de adherencia agregativa (<i>A/A</i>)

Tabla 10. Principales características de *Escherichia coli* patógena entérica en cerdos [Rodríguez-Angeles, 2002].

PATOTIPO	CUADRO CLÍNICO	EPIDEMIOLOGÍA	GENES DE VIRULENCIA
EPEC	Diarrea, malabsorción, anorexia	Ocurre en lechones de todas las edades, transmisión fecal-oral	❖ <i>eae</i> (intimina) ❖ <i>espB</i> , <i>espD</i> (genes que codifican proteínas esenciales)
ETEC	Diarrea acuosa, deshidratación, pérdida de peso	Principalmente en lechones jóvenes, transmisión fecal-oral	❖ Toxinas <i>ST</i> y <i>LT</i> ❖ adhesinas (fimbriae)
EHEC	Diarrea hemorrágica, síndrome urémico hemolítico	Principalmente en cerdos jóvenes, transmisión fecal-oral	❖ <i>Stx</i> (toxina Shiga) ❖ <i>eae</i> (intimina) ❖ Plásmido de virulencia <i>pO157</i>
EIEC	Diarrea acuosa o sanguinolenta, fiebre	Ocurre en lechones y cerdos jóvenes, transmisión fecal-oral	❖ Plásmido <i>pINV</i> ❖ proteínas <i>lpa</i>
EAEC	Diarrea persistente, formación de biopelículas	Ocurre en lechones y cerdos adultos, transmisión fecal-oral	❖ <i>AAF</i> (fimbrias de adherencia agregativa) ❖ <i>aggR</i>

4.2.1 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Este tipo de infección por EHEC se caracteriza por causar infecciones zoonóticas y por producir infección a niños y adultos, al secretar una toxina llamada Shiga su síntesis está asociada a la presencia de un bacteriófago que se encuentra insertado en el genoma [Hannaoui *et al.*, 2009]. EHEC puede producir una o más toxinas shiga (*Stx*) *stx1* y/o *stx2* y producir cuadros clínicos que van desde dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y fiebre, algunas veces suele producir síndrome urémico-hemolítico (SHU) este último está asociado a la toxina *stx2* [Vila *et al.*, 2012; OMS, 2018; Farfán-García *et al.*, 2016; CDC, 2014].

4.2.1.1 Mecanismo de patogenicidad

En cuanto a las bacterias EHEC se caracteriza por producir lesiones de adherencia/eliminación (A/E) una vez que la bacteria se adhiere al epitelio intestinal por medio de fimbria y el Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3) inyecta proteínas efectoras como “*Tir*” el cual funciona como receptor y favorece a la adherencia de la intimina bacteriana eliminando las microvellosidades en el lugar de adherencia posteriormente ocurre un reordenamiento del citoesqueleto del enterocito que estimula a la proteína “*EspP*” (*Proteína P secretada por E. coli*) y está a la toxina shiga [Hannaoui *et al.*, 2009; Farfán-García *et al.*, 2016; Carlos-Marquez. *et al.*, 2019].

4.2.2 *E. coli* enterotoxigenica (ETEC)

Este grupo es la principal causa bacteriana de diarrea del viajero y diarrea en niños, actualmente solo se ha identificado en humanos además sintetiza dos toxinas una termoestable codificada por el gen “*St*” y una termolábil codificada por el gen “*Lt*” localizados en plásmidos las cuales pueden ser secretadas ambas o una sola toxina por cepa asimismo se encargan de estimular el revestimiento de los intestinos, por otra parte las ETEC tienen la capacidad de adherirse a las células intestinales gracias a las fimbrias y pilis denominados “*factores de colonización*” (CFs). Dentro de los síntomas producidos por este grupo bacteriano se encuentra el dolor de cabeza, abdominal, náuseas y diarrea líquida [Ríos-Muñiz *et al.*, 2019; Vila *et al.*, 2012; CDC, 2014].

4.2.2.1 Mecanismo de patogenicidad

De acuerdo con la patogenia estas colonizan las células intestinales y se adhieren a los enterocitos mediante fimbrias que se unen a receptores específicos que se encuentran en la membrana de estas células para después secretar sus toxinas “*Lt*” y/o “*St*” lo que produce la inhibición de actividad guanosina trifosfatasa (GTPasa) y activa la adenilato-ciclase que a su vez aumenta las concentraciones de adenosín monofosfato ciclico (AMPc), por lo tanto, estimula la secreción de cloruro y demás electrolitos e imposibilita la absorción del intestino en

consecuencia provoca diarrea [Vila *et al.*, 2012; Farfán-García *et al.*, 2016; Carlos-Marquez *et al.*, 2019; Ríos-Muñiz *et al.*, 2019].

4.2.3 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Las cepas EPEC producen cuadros diarreicos acuosos persistentes en niños generalmente de menos de 2 años, esta puede ser de moderada a grave y puede estar acompañada de vómito y fiebre o bien asintomática, además es causa recurrente de brotes en lugares cerrados. Se clasifican en típicas y atípicas, típicas por la presencia de un plásmido de virulencia llamado “*factor de adherencia de EPEC*” (EAF) y atípicas por la ausencia de este [Vila *et al.*, 2012; Farfán-García *et al.*, 2016; Hernández-Cortez *et al.*, 2011].

4.2.3.1 Mecanismo de patogenicidad

Respecto a su capacidad de producir infecciones estas se fijan al epitelio intestinal a través de su “factor de adherencia de EPEC” (EAF) el cual por medio de un pili rizados denominados “*Bfp (bundle-forming pilus)*” pili formador de bucles y un flagelo de tipo IV logran una adherencia que posteriormente es reforzada por el SST3 el cual segrega proteínas como *tir* que es un receptor para intimina que es una adhesina, después se eliminan las microvellosidades de enterocito para una mejor adherencia lo que provoca la pérdida de absorción y por tanto la acumulación de solutos en el lumen intestinal, que conduce a una diarrea líquida. Por otra parte, el SST3 también segrega proteínas que inducen el reordenamiento de los filamentos de actina para la inducción de pedestales que son pequeñas elevaciones elaboradas de actina ubicadas en el sitio de adhesión de EPEC y poros en la membrana de la célula intestinal para la internalización de proteínas efectoras [Vila *et al.*, 2012; Farfán-García *et al.*, 2016; Sáenz *et al.*, 2022; Carlos-Marquez *et al.*, 2019].

4.2.4 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Las infecciones producidas por EAEC también frecuentemente es causa de diarrea del viajero en niños y adultos los cuales pueden presentar un cuadro clínico de diarrea acuosa, con moco y sangre, fiebre, dolor abdominal, náuseas y vómito,

sin embargo, este patotipo hasta ahora solo se ha localizado en humanos. Generalmente se caracteriza por la aglutinación producida por adhesinas flexibles y fimbrias, las cuales generan daño mediante la adherencia agregativa, además se ha descrito que contienen un plásmido AA probe (o también llamado CVD432) que se encuentra en el gen “*aap*” que codifica para una proteína transportadora, la cual es empleada para su detección por PCR, no obstante, algunas cepas pueden producir una toxina termoestable (*St*) de EAEC (*EAST-1*) [Sáenz *et al.*, 2022; Vila *et al.*, 2012; Farfán-García *et al.*, 2016; Ríos-Muñiz *et al.*, 2019].

4.2.4.1 Mecanismo de patogenicidad

En la colonización del epitelio intestinal se une por medio de fimbrias de adherencia- agregativa (AA), también actúa un complejo denominado *Aat* que se requiere para el transporte de dispersina que es una proteína que promueve la dispersión del moco y que además es codificada por el gen *aap*. Así como también el auto-transportador como la proteasa involucrada en la colonización intestinal (*Pic*) esta incrementar la secreción de moco, así mismo le abre paso a la bacteria gracias a su actividad mucinolítica. Posteriormente el gen *AggR* produce una toxina *EAST-1* que tiene actividad guanilatociclase (GC), incrementa el guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y por lo tanto altera el transporte de iones. Finalmente produce una proteasa (*Pet*) la cual rompe a la espectrina (proteína estructural, da soporte a la membrana celular) que se encuentra unida a la actina para bloquear su función y provocar cambios en la morfología de la célula que indiquen la permeabilidad de la membrana [Farfán-García *et al.*, 2016; Carlos-Marquez *et al.*, 2019; Ríos-Muñiz *et al.*, 2019].

4.2.5 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Se caracteriza principalmente por invadir y multiplicarse dentro del epitelio intestinal, ya que carece de fimbrias, además, posee un plásmido de virulencia (*pINV*) y los antígenos de invasión de plásmidos (*Ipa*) *Ipa A*, *Ipa B*, *Ipa C*, *Ipa D*, por mencionar algunos. Por otro parte, tiene particular relevancia por infectar a niños y adultos, sin embargo, dentro de los síntomas que pueden llegar a presentarse son la diarrea con moco, sangre y dolor abdominal, no obstante, en

algunos casos solo produce diarrea [Vila *et al.*, 2012; Farfán-García *et al.*, 2016; Carlos-Marquez *et al.*, 2019].

4.2.5.1 Mecanismo de patogenicidad

Inicialmente invade a las células M (enterocitos especializados en la captación de antígenos) para después ser internalizada en una vacuola fagocítica por transcitosis en la cual posteriormente provoca lisis al producir *Ipa B*, posteriormente es fagocitada por los macrófagos debido a esto produce apoptosis por vía caspasa-1 para ser liberada y dirigirse a la zona basolateral. Más tarde ingresa a los enterocitos por medio de receptores *CD44* y $\alpha 5\beta 1$ integrina que reconocen a *IpaB* y al complejo *IpaBCD* de la bacteria. Finalmente se reproduce en el citoplasma y se libera del fagosoma mediante *IpgD*, se conforma el complejo VirG/N-WASP/actina debido a que *VirG* que se encuentra en un extremo de EIEC y promueve la aproximación de N- WASP *VirA* y por medio de la polimerización de actina, se forma el complejo que favorece el proceso de invasión a células proximales [Farfán-García *et al.*, 2016; Carlos-Marquez *et al.*, 2019].

4.2.6 *E. coli* adherente difusa (DAEC)

A diferencia de los demás patotipos, estas presentan dos tipos de adhesinas que facilitan la adherencia a los enterocitos, la adhesina fimbrial y la adhesina relacionada con la adherencia difusa (AIDA-I). Principalmente causa enfermedad en niños menores de 5 años, dentro de los síntomas generados estos se han asociado a procesos diarreicos agudos y persistentes [Farfán-García *et al.*, 2016; Carlos-Marquez *et al.*, 2019].

4.2.6.1 Mecanismo de patogenicidad

Respecto a la patogenia de DAEC estas se adhieren al epitelio intestinal mediante adhesinas fimbriales localizadas en la membrana externa de la bacteria, la cual se une a un receptor (*hDAF*) y produce un alargamiento en las microvellosidades del enterocito. También pueden adherirse por medio de adhesinas AIDA-I que es un transportador de membrana externa esta se une a los receptores de membrana del enterocito (*hDAF*) y activa la cinasa *Src* que a su vez produce la organización

y movilización de *hDAF* alrededor de la célula, lo que origina una elongación, para posteriormente la pérdida de microvellosidades y por tanto de su función, es decir la secreción de electrolitos y agua, también ocasiona el redondeamiento de proteínas en el citoesqueleto del enterocito lo que produce un aumento en la permeabilidad de la membrana de este. De igual forma la unión de adhesinas fimbriales a los receptores *DAF* origina la activación de MAPK (proteína cinasas activadas por mitógenos) el cual resulta en la síntesis de IL-8 que produce la trans migración de polimorfonucleares (PMN). Lo cual favorece a la síntesis de citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT- α) y la interleucina-1beta (L1 β) lo que genera apoptosis en los enterocitos [Farfán-García *et al.*, 2016; Carlos-Marquez *et al.*, 2019].

4.3 Antibióticos

Los antibióticos son compuestos o sustancias químicas que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos, debido a que inducen una acción específica sobre alguna estructura o función de las bacterias además son esenciales para prevenir y tratar infecciones producidas por bacterias específicas, así mismo pueden ser producidas de forma natural por algunos microorganismos o sintéticas [Cué-Brugueras *et al.*, 1998; CDC, 2020; Camacho, 2023].

4.3.1 Clasificación de acuerdo con su espectro de acción

Debido a que los antibióticos ejercen acciones específicas pueden actuar de diferentes formas y en diferentes sitios sobre bacterias de la misma forma pueden clasificarse mediante su espectro de acción en antibióticos de:

- **Amplio espectro:** Aquellos antibióticos que actúan sobre microorganismo Gram positivos y Gram negativos como Meropenem, Ciprofloxacino, Cloranfenicol.
- **Espectro reducido:** Aquellos antibióticos que tienen acción frente a un determinado grupo de microorganismos y frente a Gram positivos, como vancomicina, Amikacina [Cué-Brugueras *et al.*, 1998].

4.3.2 Clasificación de acuerdo con su mecanismo de acción

De este modo, con base al mecanismo de acción pueden clasificar en los siguientes grupos (Figura 1):

- I. Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana: bloquea la síntesis del peptidoglicano.
- II. Alteración en la membrana plasmática: produce cambios en la permeabilidad de la membrana.
- III. Inhibición de la síntesis proteica: En los ribosomas bloquea la síntesis de proteínas.
- IV. Alteración o Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos: Altera el proceso de replicación e impide la transcripción.
- V. Inhibición de la síntesis de factores metabólicos: Bloquea la ruta de síntesis de metabolitos esenciales como la inhibición de la incorporación de PABA para la formación del ácido fólico [Camacho, 2023; Martínez-Martínez *et al.*, 2010].

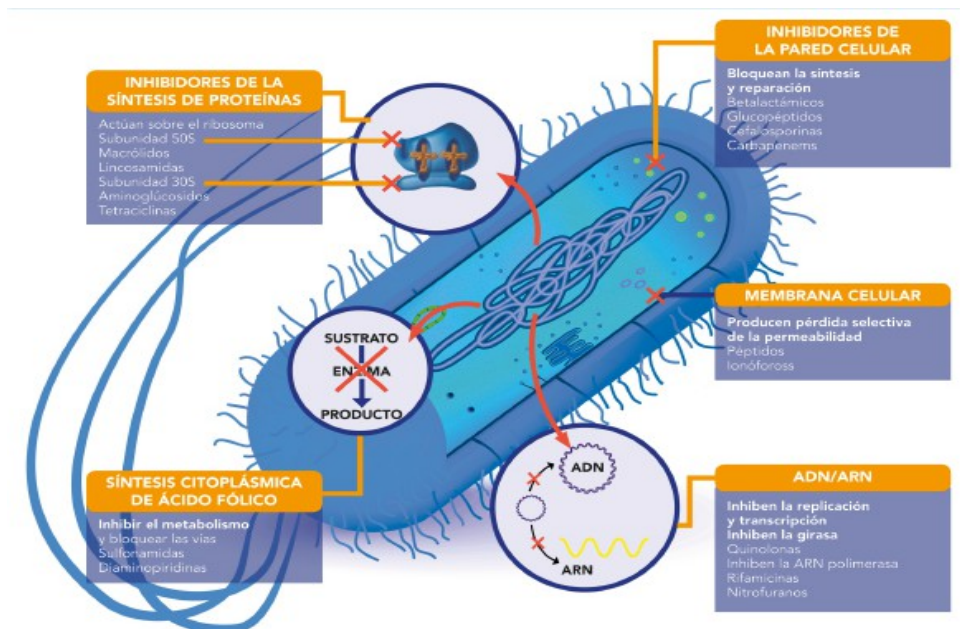


Figura 10. Mecanismo de acción de distintos antibióticos. Clasificados en 5 grupos: A) Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana B) Alteraciones en la membrana plasmática C) Inhibidores de la síntesis proteica D) Inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos E) Inhibidores de la síntesis de factores metabólicos [Murillo F.J, 2020].

4.3.3 Clasificación de acuerdo con su composición química

Además, pueden clasificarse en familias según su estructura química en: Betalactámicos, Aminoglucósidos, Tetraciclinas, Quinolonas, Sulfamidas, Lincosamidas, Glucopéptidos, Cefalosporinas, Fenicoles (Tabla 3) [Cué-Brugueras *et al.*, 1998; Suárez *et al.*, 2009; Gonzalo-de-Lira, 2005].

4.4 Resistencia Bacteriana

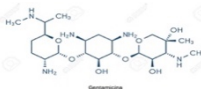
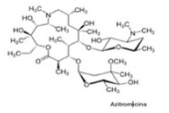
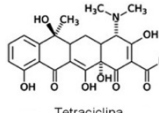
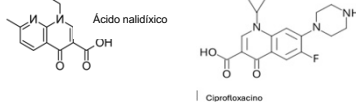
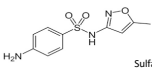
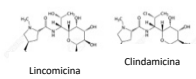
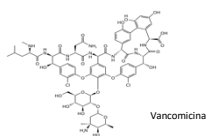
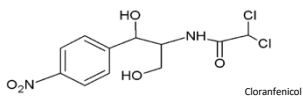
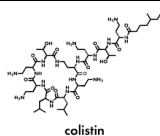
La resistencia bacteriana se define como la capacidad que tiene una bacteria para resistir y sobrevivir a la acción de un fármaco, este mecanismo de resistencia se produce de forma natural, también puede ser inducido o desarrollado por la bacteria en presencia de presión selectiva frente a un antibiótico, para su supervivencia. Esta presión de selección es generalmente causada por el uso inapropiado de los antibióticos, la dosis y duración inadecuada del tratamiento en humanos y el abuso de ciertos antibióticos como factor de crecimiento y/o profilácticos en industrias pecuarias [Garza-Ramos *et al.*, 2009; Mosquito *et al.*, 2011; Rivera *et al.*, 2012].

Actualmente el uso irracional e indiscriminado y la presión de evolución ejercida por el uso de fármacos han propiciado un aumento de cepas resistentes, además tiene la capacidad de causar afecciones a personas de cualquier edad de la misma forma a industrias pecuarias y/o veterinarias convirtiéndolo en un problema de salud mundial con sentido de urgencia crítico [Pérez-Cano *et al.*, 2013; CDC, 2022; Quintero-Hernández, 2021]. Ya que las infecciones causadas por bacterias resistentes representan una de las principales causas de morbilidad, mortalidad y el incremento de costo de estancias intrahospitalarias [OMS,2020].

La resistencia puede presentarse de forma natural o intrínseca y adquirida, el tipo de resistencia natural o intrínseca es específica de cada especie o grupo de bacterias, es determinado genéticamente, es decir no tiene relación con la dosis de exposición del antibiótico en cuanto a la resistencia adquirida se produce a través de mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones), este tipo de resistencia está asociada al uso

inadecuado o abuso de los antibióticos [Pérez-Cano *et al.*, 2013]. Este tipo de resistencia representa un gran problema a nivel mundial debido a que las bacterias pueden obtener resistencia de uno o varios antibióticos sin estar expuestos a estos [Calderón *et al.*, 2016; Garza- Ramos *et al.*, 2009].

Tabla 11. Clasificación de los antibióticos de acuerdo con su composición.

Estructura Química	Antibiótico	Composición química
β -lactámicos	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenémicos y Monobactámicos.	 Anillo beta-lactámico
Aminoglucósidos	Amikacina, Kanamicina, Tobramicina, Gentamicina, Neomicina, Estreptomicina.	 Gentamicina
Macrólidos	Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina.	 Azitromicina
Tetraciclinas	Tetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Tigeciclina, Oxitetraciclina.	 Tetraciclina
Quinolonas y Fluoroquinolonas*	Ácido Nalidixico, Norfloxacin*, Ciprofloxacino*, Levofloxacin*, Moxifloxacin*.	 Ácido nalidixico Ciprofloxacino
Sulfamidas o Sulfonamidas	Sulfametoxazol.	 Sulfametoxazol
Lincosamidas	Clindamicina, Lincomicina.	 Lincomicina Clindamicina
Glucopéptidos	Vancomicina, Teicoplanina.	 Vancomicina
Fenicoles	Cloranfenicol.	 Cloranfenicol
Polimixinas	Polimixina B, Colistina.	 colistin

4.4.1 Mecanismos de resistencia bacteriana

Los mecanismos de resistencia que han desarrollado las bacterias para resistir a la acción de los antibióticos se muestran en la figura 2:

1. **Alteración en la permeabilidad de la membrana externa:** Cambios estructurales principalmente en las porinas que bloquean la entrada del antibiótico a la célula.
2. **Modificación enzimática del antibiótico:** Mediado por la producción de enzimas que inactivan la acción del antibiótico, como en el grupo de los Betalactámicos, las betalactamasas hidrolizan al anillo betalactámico.
3. **Modificación del sitio de acción:** Producido por mutaciones en los sitios donde ejercen su acción los antibióticos, como las proteínas de unión a penicilinas (PBP's) que son el sitio blanco de los Betalactámicos
4. **Bombas de expulsión:** Se encuentran en la membrana celular externa y actúan internalizando y expulsando el antibiótico evitando que este llegue a su sitio de acción
5. **Material genético foráneo:** Los genes de resistencia están relacionados con los elementos móviles genéticos como los plásmidos, transposones e integrones, sin embargo, el integrón funcionan como un casete de expresión para los genes que se introduzcan que con frecuencia son más de uno, de tal manera que es posible una multiresistencia que se disemina mediante transposones o plásmidos. [Garza-Ramos *et al.*, 2009; Calderón *et al.*, 2016; Martínez-Martínez *et al.*, 2010; Quintero-Hernández, 2021].

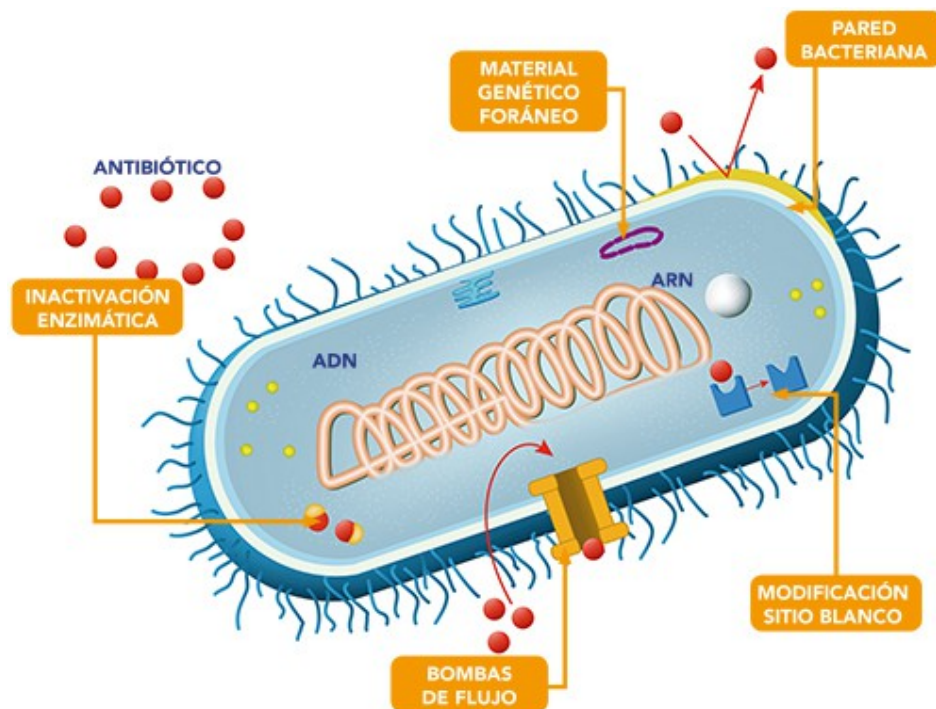


Figura 11. Mecanismos de resistencia bacteriana. 1) Inactivación enzimática del antibiótico, 2) Bombas de eflujo, 3) Modificación del sitio de acción o sitio blanco, 4) Alteración en la permeabilidad de la pared bacteriana 5) Material genético foráneo (Elementos móviles genéticos) [Murillo F.J, 2020].

4.5 Epidemiología de *Escherichia coli*

La resistencia de *Escherichia coli* a C3G, como ceftazidima y cefotaxima, es una preocupación creciente en salud pública y veterinaria. Esta resistencia se debe principalmente a la producción de BLEE, que inactivan estos antibióticos.

4.5.1 Epidemiología en Humanos

En humanos, se ha observado un aumento significativo de infecciones causadas por *E. coli* productora de BLEE, especialmente en infecciones urinarias y septicemias. Estudios en Colombia reportan que el 7.1% de los aislamientos de *E. coli* fueron positivos para BLEE, con una alta resistencia a ceftazidima y cefotaxima. Además, se encontró resistencia a otros antibióticos como ampicilina, cefalotina y ciprofloxacina, lo que complica el tratamiento de estas infecciones [Pérez, *et al.*, 2011].

4.5.2 Epidemiología en porcinos

En el ámbito veterinario, particularmente en porcinos, se ha detectado la presencia de

E. coli resistente a cefotaxima. Un estudio en Argentina encontró que, de 56 muestras fecales de cerdos, 31 aislamientos fueron resistentes a cefotaxima. Además, se observó multiresistencia a otros antimicrobianos, incluyendo ácido nalidíxico y ciprofloxacina. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación se relacionó principalmente con el gen *bla*CTX-M [Gómez, et al., 2022].

La presencia de *E. coli* resistente a ceftazidima y cefotaxima en humanos y porcinos indica una diseminación de genes de resistencia entre animales y humanos, posiblemente facilitada por el uso de antibióticos en la producción animal y la cadena alimentaria. Este fenómeno resalta la necesidad de implementar medidas de control y uso racional de antibióticos tanto en medicina humana como veterinaria para mitigar la propagación de cepas multirresistentes.

5. ANTECEDENTES

La OMS estima en la región americana que al año 77 millones de personas se enferman al consumir alimentos contaminados, de las cuales mueren alrededor de 9.000. De las personas que se enferman, 31 millones son menores de 5 años y de ellos mueren más de 2.000 al año, de los cuales 95% de los casos son originados por 3 especies bacterianas entre ellas *E. coli*. En comparación con Europa en donde reporta que se enferman más de 23 millones de personas cada año, al ingerir alimentos contaminados y se producen 5.000 muertes [OMS, 2015]. La CDC reportó en Estados Unidos en el 2019 un brote de infecciones gastrointestinales producidas por la cepa *E. coli* O103 relacionadas a la carne molida, en donde se notificaron 209 casos de personas infectadas con la cepa del brote en 10 estados, de los cuales 29 requirieron atención hospitalaria. Esta cepa se identificó en una muestra de carne molida recolectada de un lugar donde las personas enfermas aseguraron haber comido, se realizaron técnicas moleculares como electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y secuenciación del genoma completo (WGS) para determinar el serotipo de *E. coli* [CDC, 2019].

Actualmente en México, existen pocos estudios que adopten el enfoque "Una sola salud" en relación con *Escherichia coli* intraintestinal, lo que subraya la importancia de este proyecto. Sin embargo, la SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) reportó hasta marzo del 2024, 120, 029 casos de enfermedad diarreica asociadas a *Escherichia coli* y *Salmonella spp* [SINAVE, fuente electrónica]. La escasez de investigaciones en este ámbito resalta la necesidad de establecer políticas y estrategias más robustas para abordar este problema de salud pública de manera integral.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las características moleculares y los mecanismos de resistencia a β -lactámicos presentes en cepas multirresistentes de *Escherichia coli* aisladas de humanos y cerdos, y cómo se distribuyen los genes *blaCTX-M*, *blaSHV* y *blaTEM* en ambos reservorios?

7. JUSTIFICACIÓN

La creciente diseminación de cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, en particular las productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), representa una amenaza crítica para la eficacia de antibióticos esenciales como las cefalosporinas de tercera generación (C3G), incluyendo ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX). Estas BLEE, al hidrolizar los β -lactámicos, limitan las opciones terapéuticas disponibles y complican el tratamiento de infecciones tanto en humanos como en animales.

En medicina veterinaria, el uso de CAZ y CTX para fines terapéuticos, preventivos e incluso como promotores de crecimiento ha favorecido la selección de cepas resistentes, especialmente en animales destinados al consumo humano. Esta situación adquiere mayor relevancia en la interfase salud humana-animal, donde la proximidad entre ambos hospederos y el uso frecuente de antimicrobianos incrementan el riesgo de transferencia de genes de resistencia.

En México, y particularmente en el estado de Morelos, existe una carencia de estudios que caractericen molecularmente cepas de *E. coli* resistentes a CAZ y CTX en humanos y animales. Esta falta de información limita la comprensión de la dinámica de la resistencia y dificulta el diseño de estrategias efectivas de control.

Este estudio busca aportar evidencia sobre la circulación de *E. coli* resistente a C3G en ambos reservorios, evaluando su perfil molecular y los mecanismos de resistencia implicados. A nivel regional, el sistema de vigilancia antimicrobiana SENTRY (Red de laboratorios a nivel mundial) ha reportado una prevalencia del 45 % de *E. coli* BLEE en América Latina, lo que refuerza la necesidad de estudios locales como este, que contribuyan a fortalecer la vigilancia y el uso racional de antimicrobianos bajo un enfoque integral de Una Sola Salud.

8. HIPÓTESIS

Las cepas de *Escherichia coli* resistentes a ceftazidima y cefotaxima aisladas de humanos y cerdos en un modelo de interfase salud humana-animal comparten mecanismos de resistencia, perfiles genéticos y posibles relaciones clonales, lo que sugiere un vínculo epidemiológico entre ambos reservorios.

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo General

Caracterizar molecularmente cepas de *Escherichia coli* resistentes a ceftazidima y cefotaxima, de origen humano y porcino, aisladas de un modelo de interfase salud humana-animal.

9.2 Objetivos Específicos

- Identificar los mecanismos de resistencia a ceftazidima y cefotaxima en aislamientos de *Escherichia coli* de origen humano y porcino.
- Determinar la relación clonal entre cepas de *Escherichia coli* resistente a antibióticos β -lactámicos aisladas de humanos y cerdos.
- Establecer los filogrupos presentes en *Escherichia coli* resistente a ceftazidima y cefotaxima
- Analizar el perfil de plásmidos en *Escherichia coli* resistente a ceftazidima y cefotaxima.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 Esquema de Trabajo

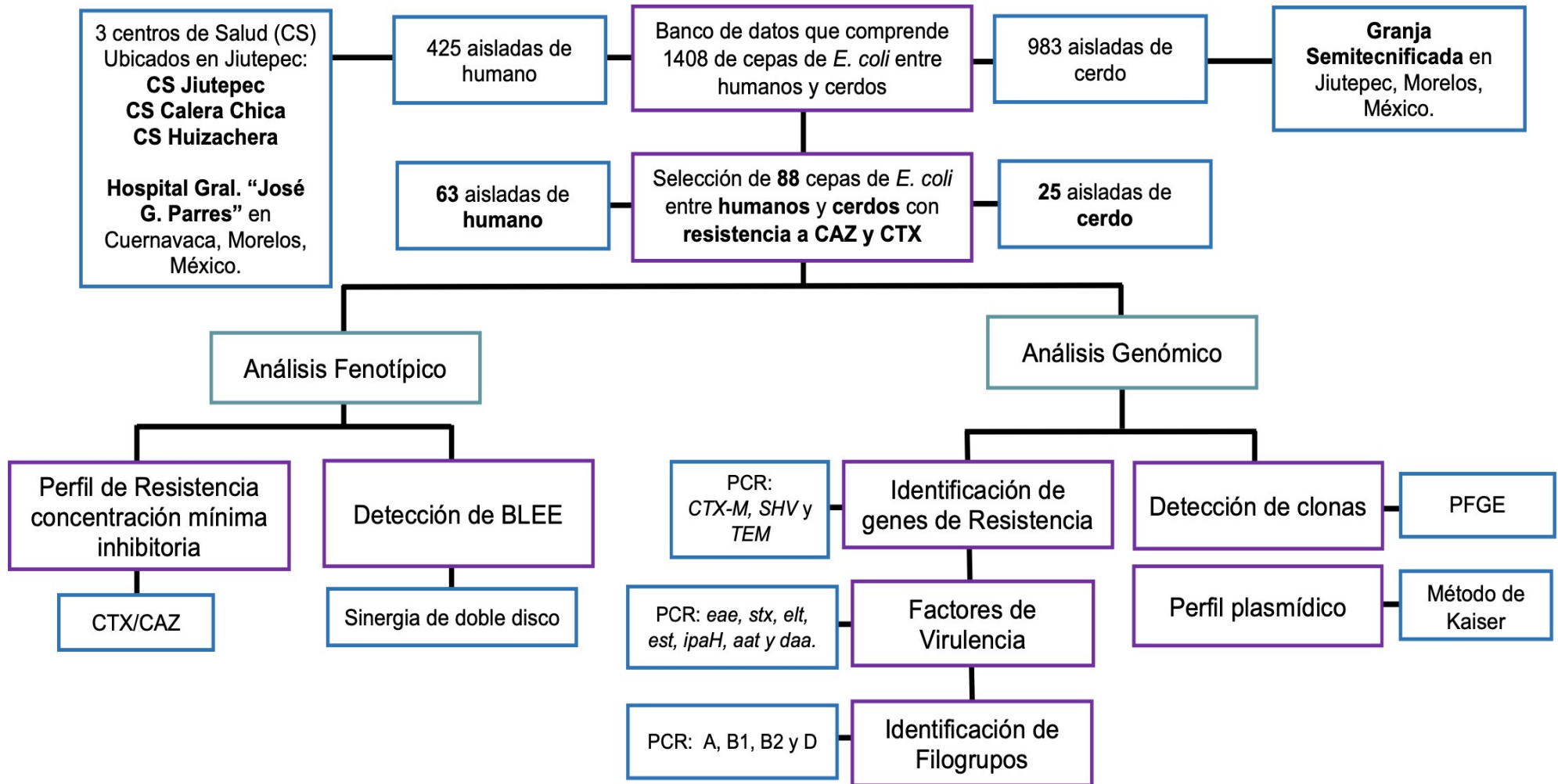


Figura 12. Esquema general de trabajo para la realización del estudio sobre la caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos y cerdos

10.2 Estudio experimental

10.2.1 Selección de las cepas

Se seleccionaron 88 cepas de *E. coli* previamente identificadas que forman parte de la base de datos del laboratorio de Epidemiología de Enfermedades Infecciosas del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Del total de las cepas seleccionadas, 63 cepas fueron recuperadas de materia fecal de humanos provenientes de tres Centros de Salud (CS) colindantes con la granja porcina (CS Jiutepec, CS Huizachera, CS Calera Chica) y el Hospital General de Cuernavaca “José G. Parres” (HGC), y 25 cepas aisladas de materia fecal de cerdos de una granja porcina semitecnificada ubicada en Jiutepec, Morelos. La selección de las cepas se realizó de acuerdo con su perfil de multiresistencia y que fueran resistentes a C3G específicamente cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ). Todas las cepas de *E. coli* seleccionadas se sembraron en cajas de Petri con agar MacConkey (MC: MCD Lab®, México) suplementado con CTX y CAZ (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) a una concentración de 1 µg/mL y se incubaron a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas para confirmar dicha resistencia (Figura 4).

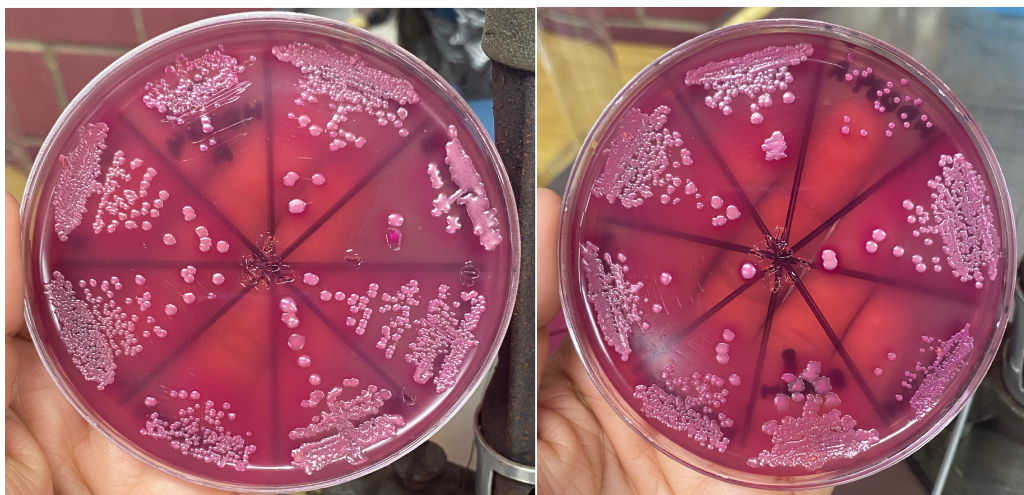


Figura 13. Confirmación de la resistencia a cefalosporinas de 3^{ra} generación. *Escherichia coli* crecida en cajas de Petri con agar MacConkey suplementado con ceftazidima y cefotaxima a una concentración de 1 µg/mL.

10.2.2 Prueba confirmatoria de doble disco para determinar BLEE

La detección de cepas sospechosas de producir Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) se confirmó fenotípicamente mediante el método de sinergia de doble disco, siguiendo los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2023). Para ello, se utilizaron discos de antibióticos con cefotaxima (CTX) 30 µg, CTX/ácido clavulánico (CLA) 30/10 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg y CAZ/CLA 30/10 µg. A partir de cultivos frescos en cajas Petri con medio MC suplementado con CTX y CAZ a una concentración de 1 µg/mL, se seleccionaron una o dos colonias con un asa de siembra y se re-suspendieron en 5 mL de solución salina (NaCl 0.85%) dentro de un tubo de ensayo. La turbidez de la suspensión bacteriana se ajustó a una absorbancia de 0.08 a 0.13 a 625 nm, equivalente a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland (1×10^8 UFC).

Posteriormente, la solución ajustada se inoculó en placas de agar Müller-Hinton (MH: MCD Lab®, México) mediante un hisopo estéril. Sobre la superficie del agar se colocaron los discos de antibióticos CTX y CAZ, tanto solos como en combinación con el inhibidor ácido clavulánico (CTX-CLA y CAZ-CLA), manteniendo una distancia de 2 cm entre discos. Las placas se incubaron a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 horas. Tras la incubación, los resultados se interpretaron midiendo los halos de inhibición alrededor de cada disco. Se consideró una posible *E. coli* productora de BLEE (*E. coli*-BLEE) cuando la diferencia en el diámetro del halo de inhibición entre CAZ y CAZ/CLA o CTX y CTX/CLA fue de ≥ 5 mm [Marrero-Moreno *et al.*, 2017].

10.2.3 Extracción de DNA

10.2.3.1 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA de las cepas de *E. coli* se realizó por choque térmico. La técnica consiste en someter a estrés a la bacteria a través de cambios extremos en la temperatura, esto se realizó tomando de una a dos colonias puras de bacteria a partir de un cultivo fresco y se disolvieron en 300 µL de agua grado milliQ en un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente se colocaron los microtubos en un baño María a 95°C durante 5 minutos (min) y después se pusieron a -20°C por 5 min. Este proceso se repitió dos veces. Se centrifugaron las cepas a 12,000 rpm por 2 min

para obtener 200 µL del sobrenadante, los cuales se colocaron en un microtubo limpio, estéril y bien etiquetado almacenándose a -20°C hasta su uso. La pastilla celular se desechó. Finalmente, se realizó una electroforesis a 110 voltios por 30 min en un gel de agarosa al 1% con TAE 1X y teñido con SYBR® Green (Invitrogen, Eugene, OR, USA) para confirmar la extracción de DNA a través de un transiluminador de luz UV.

10.2.3.2 Extracción de DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico para la determinación del perfil de plásmidos se realizó por el método Kieser [Kieser, 1984], la cual consiste en realizar la incubación overnight a 37°C de las cepas en 5 ml de medio Mueller Hinton líquido en agitación, posteriormente se pone el cultivo en microtubos de 1.5 ml y se centrifuga a 14,000 rpm, esto hasta terminar el medio de cultivo y obtener la pastilla de bacterias. Se adicionan 400µl de la solución 1 y se suspende la pastilla, después se agregan 100µl de lisozima [10mg/ml] y agitar suavemente por inmersión 6 veces, posteriormente se incuba 30 min el hielo y se adicionan 250µl de la solución 2 por las paredes del tubo y se mezcla por inmersión, para después incubar por 30min a 55°C y temperar en agua por 10 min. Se agregan 80µl de fenol-cloroformo-isoamílico y se agita con ayuda de un vortex hasta ver una consistencia lechosa y se centrifuga a 13,000 rpm durante 20min a 4°C. Finalmente se recuperó el sobrenadante 500µl y se pone en un tubo limpio para su conservación a -20°C [Figueroa-Bossi *et al.*, 2022].

10.2.4 Amplificación de los genes de resistencia para BLEE

La amplificación de los genes de resistencia a betalactámicos (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}), se determinó a partir de la amplificación de un fragmento de DNA mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final usando un termociclador (i-Cycler BIO-RAD®, México). Los oligonucleótidos específicos y las condiciones de PCR se muestran en las tablas 3 y 4. Los productos amplificados se analizaron por una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con buffer TAE 1X y teñido con SYBR® Green. La corrida de electroforesis se hizo durante 50 minutos a 100 voltios, 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}.

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de resistencia, *blaCTX-M*, *blaSHV* y *blaTEM* por la técnica de PCR punto final.

TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA GENES DE RESISTENCIA					
GEN	NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5' – 3'	TAMAÑO (pb)	TM (°C)	REFERENCIAS
blaCTX-M	CTX-Muniv-F	TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA	544	58 °C	Donación por la Dra. Nadia Rodríguez*
	CTX-Muniv-R	CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT			
blaSHV	P-1	ACT GAA TGA GGC GCT TCC	323 pb	60 °C	
	P-2	TCC CGC AGA TAA ATC ACC			
blaTEM	TEM-F	CAA CAT TTT CGT GTC GCC C	844 pb	58 °C	
	TEM-R	GCT TAA TCA GTG AGG CAC C			

* Dra. Nadia Rodríguez: [Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Laboratorio de Resistencia Bacteriana. Cuernavaca, Morelos].

Tabla 13. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia *blaCTX-M*, *blaSHV* y *blaTEM*

CONDICIONES DE PCR							
Genes de Resistencia	Desnaturalización Inicial	Paso 1	Alineación	Paso 3	Extensión Final		Tamaño (pb)
<i>blaCTX-M</i>	92°C 4 min	92°C 30seg.	58°C 50 seg.	72°C 50 seg.	72°C 2 min	4°C ∞	544 pb
<i>blaTEM</i>	1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo		844 pb
<i>blaSHV</i>	92°C 4 min	92°C 30seg.	60°C 50 seg.	72°C 50 seg.	72°C 2 min	4°C ∞	323 pb
	1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo		

10.2.5 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. 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: CONDA Pronadisa, Madrid, España), 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), re-suspendiéndose en 440 µL de la misma solución.

Después se mezcló con un volumen conocido de agarosa D1 LOW EEO (CONDA Pronadisa, Madrid, España) 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 (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA) 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 (New England BioLabs Inc., Ontario, Canadá) durante 17 horas. Después se separaron los fragmentos de DNA por electroforesis en gel por campos pulsados, en un sistema de electroforesis CHEF-DR II system (BioRad, Birmingham, UK) 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 Inc., Ontario, Canadá) se usó como marcador estándar de peso molecular. 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 clonales se analizaron los perfiles de restricción visual, usando los criterios de Tenover [Tenover *et al.*, 1995].

10.2.6 Identificación del filogrupo en *Escherichia coli*

La clasificación de *E. coli* en grupos filogenéticos, se realizó de acuerdo con el método de Clermont, donde se determina la presencia o ausencia de genes específicos o “housekeeping”, los cuales son genes altamente conservados que se expresan constantemente y se encuentran asociados a funciones esenciales para el metabolismo y supervivencia, así como genes asociados a la virulencia [Clermont *et al.*, 2000, Clermont *et al.*, 2013]. Se realizó la detección de los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* por la técnica de PCR punto final con el termociclador i-Cycler BIO-RAD® utilizando los oligonucleótidos y condiciones de PCR que se ilustran en las tablas 6 y 7 respectivamente. La clasificación de *E. coli* en los filogrupos A, B1, B2 y D se realizó siguiendo el esquema de Clermont con algunas modificaciones

(Tabla 8). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X y teñido con SYBR® Green. La corrida de electroforesis se hizo durante 50 minutos a 100 voltios, para finalmente visualizar los geles con un transiluminador de luz UV y detectar la presencia o ausencia de los genes para la asignación del filogrupo.

Tabla 14. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* por PCR punto final.

OLIGONUCLEOTIDOS					
GENES HOUSEKEEPING	NOMBRE DEL OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (pb)	TM (°C)	REFERENCIA
chuA	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	59°C	Clermont et al., 2000
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
yjaA	YjaA.1	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG	211		
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
TspE4.C2	TspE4C2.1	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152		
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			

Tabla 15. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*.

CONDICIONES DE PCR						
GENES HOUSEKEEPING	DESNATURALIZACIÓN INICIAL	PASO 1	ALINEACIÓN	PASO 3	EXTENSIÓN FINAL	
<i>chuA</i>	92°C	92°C	59°C	72°C	72°C	4°C
<i>yjaA</i>	4 min	30 seg.	50 seg.	50 seg.	2 min	∞
<i>TspE4.C2</i>	1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo	

Tabla 16. Genotipos y Asignación de los filogrupos para *Escherichia coli*. Fuente: Modificado de Clermont et al., 2000.

Agrupación filogenética de <i>E. coli</i>			
<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>	Grupo filogenético
-	-	-	A
-	+	-	A
-	-	+	B1
-	+	+	B1
+	+	-	B2
+	+	+	B2
+	-	-	D
+	-	+	D

10.2.7 Determinación del perfil plasmídico

Para determinar el tamaño de los plásmidos, una vez hecha la extracción del DNA plasmídico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% utilizando buffer TBE 1x como buffer de corrida. Para la corrida se tomaron 40µl del DNA plasmídico más 10µl de colorante “loading buffer” o buffer de muestra y la mezcla se colocó en el posillo del gel. El gel se corre a 60V en frío (4°C) durante 6 hrs. Se tiñe el gel al día siguiente con Bromuro de Etidio y se visualiza en el transiluminador. Posteriormente, se estimó el tamaño de las bandas de DNA plasmídico de cada cepa de *E. coli* por medio de regresión lineal de acuerdo con su movilidad relativa tomando como referencia el perfil plasmídico de la cepa *E. coli* 50192, la cual contiene cuatro plásmidos insertados de tamaños conocidos (154 kb, 66kb, 48kb y 7kb) [Kieser, 1984].

11 RESULTADOS

11.1 Selección de las cepas.

De una base de datos de cepas de *E. coli* aisladas de materia fecal de humanos y cerdos, se seleccionaron 85 cepas de humanos y 30 de cerdos con resistencia a CAZ y/o CTX. En humanos, se confirmó la resistencia a estos antibióticos en 63/85 (74.11%), que provienen del CS Jiutepec (13/85, 15.29%), CS Huizachera (9/85, 10.59%), CS Calera Chica (8/85, 9.41%), HGC “Dr. José G. Parres” (31/85, 36.47%) y trabajadores de la granja porcina (2/85, 2.35%). En cerdos, la resistencia se confirmó en 25/30 (83.33%). La distribución de resistencia dentro de las cepas ya resistentes a CAZ y/o CAZ/CTX de origen humano y porcino se muestran en las figuras 5 y 6 respectivamente.

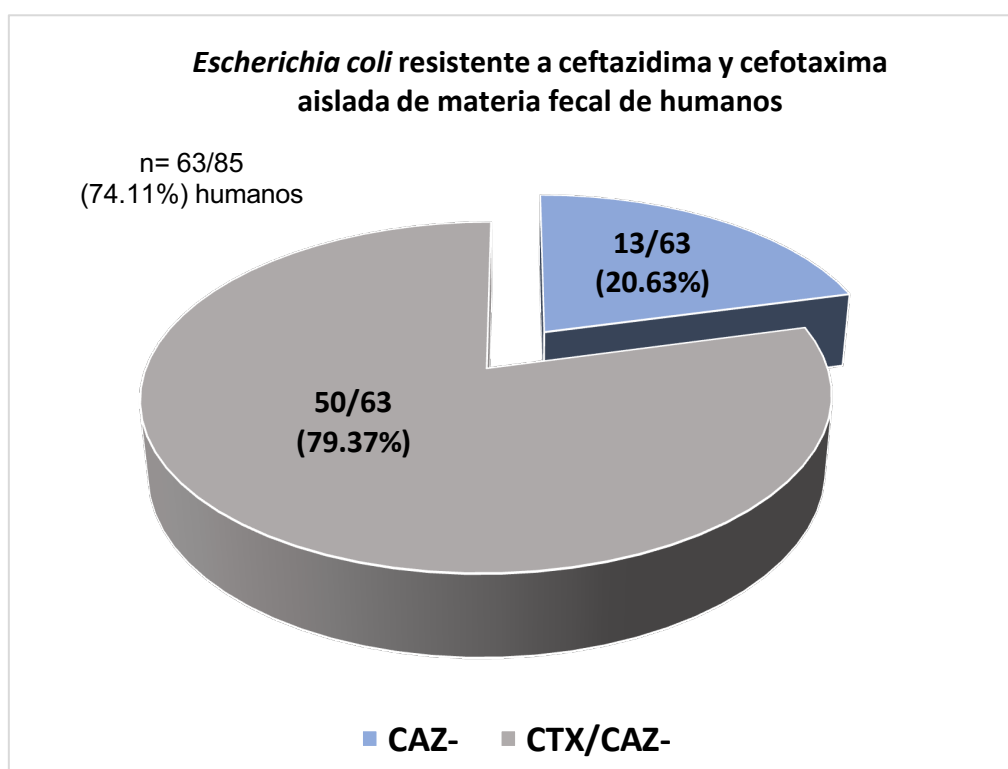


Figura 14. Distribución de la resistencia a ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX) en aislamientos de *Escherichia coli* de origen humano. Se evaluaron 63 cepas resistentes, de las cuales el 79.37% (50/63) mostró resistencia a CAZ y el 20.63% (13/63) a CTX.

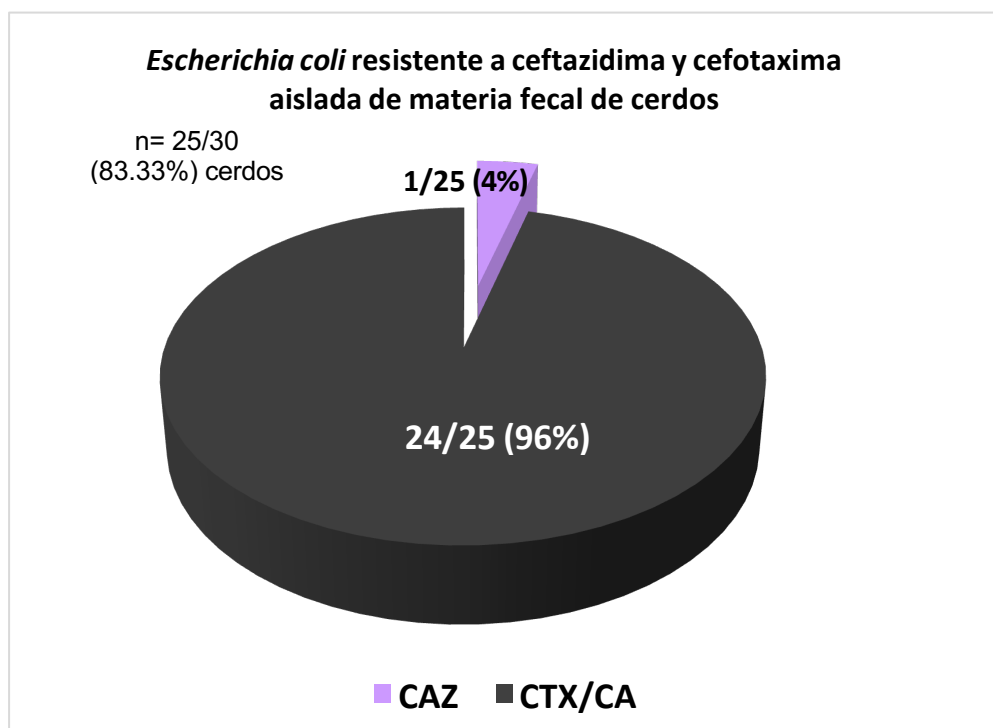


Figura 15. Distribución de la resistencia a ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX) en aislamientos de *Escherichia coli* de origen porcino. Se evaluaron 25 cepas resistentes, de las cuales el 96% (24/25) mostró una resistencia a CTX/CAZ y el 4% (1/25) a CAZ.

11.2 Prevalencia de BLEE y distribución de genes de resistencia.

Se evaluaron 88 cepas de *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, de las cuales 63 fueron aisladas de humanos y 25 de cerdos. La proporción de cepas productoras de BLEE fue del 67% (42/63) en humanos y del 92% (23/25) en cerdos (Figura 7), lo que indica una alta frecuencia de este mecanismo en ambos reservorios. Los genes asociados a BLEE detectados con mayor frecuencia fueron *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*SHV, con diferencias entre hospedadores. En humanos, el gen *bla*CTX-M fue el más prevalente (44.5%), seguido de *bla*TEM (27%) y *bla*SHV (5%). En cerdos, *bla*CTX-M también predominó (76%), pero se observó una mayor representación de *bla*SHV (52%) en comparación con humanos, y menor frecuencia de *bla*TEM (36%). Al considerar el total de cepas analizadas (n=88), la prevalencia global de los genes asociados a BLEE fue del 53.4% (47/88) para *bla*CTX-M, 29.5% (26/88) para *bla*TEM y 18.1% (16/88) para *bla*SHV.

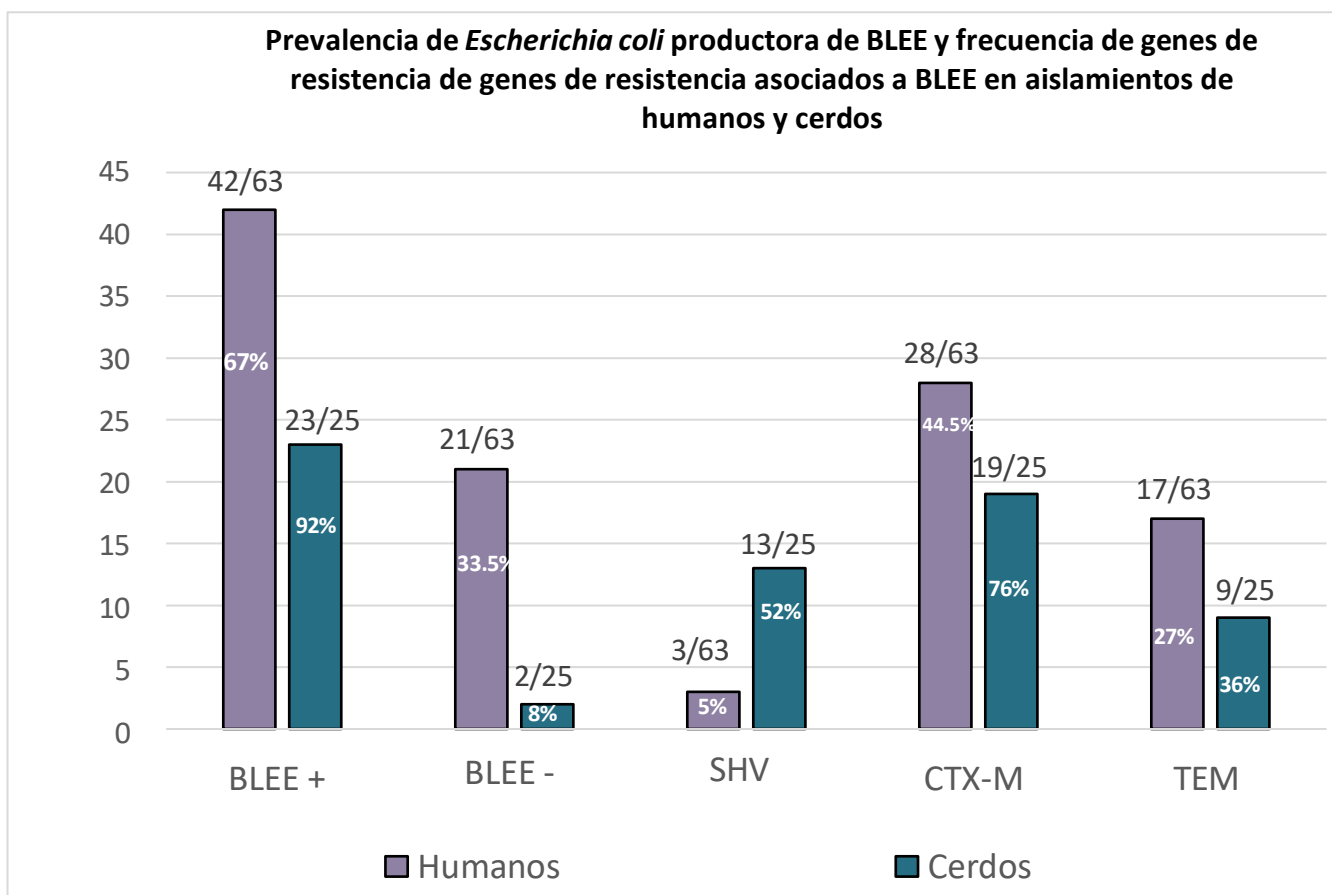


Figura 16. Prevalencia de BLEE y distribución de genes de resistencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos ($n=63$) y cerdos ($n=25$). Se observó una alta proporción de cepas productoras de BLEE en ambas poblaciones, con mayor frecuencia en cerdos (92%) que en humanos (67%). El gen *bla*CTX-M fue el más común en ambos grupos, mientras que *bla*SHV fue más prevalente en cerdos.

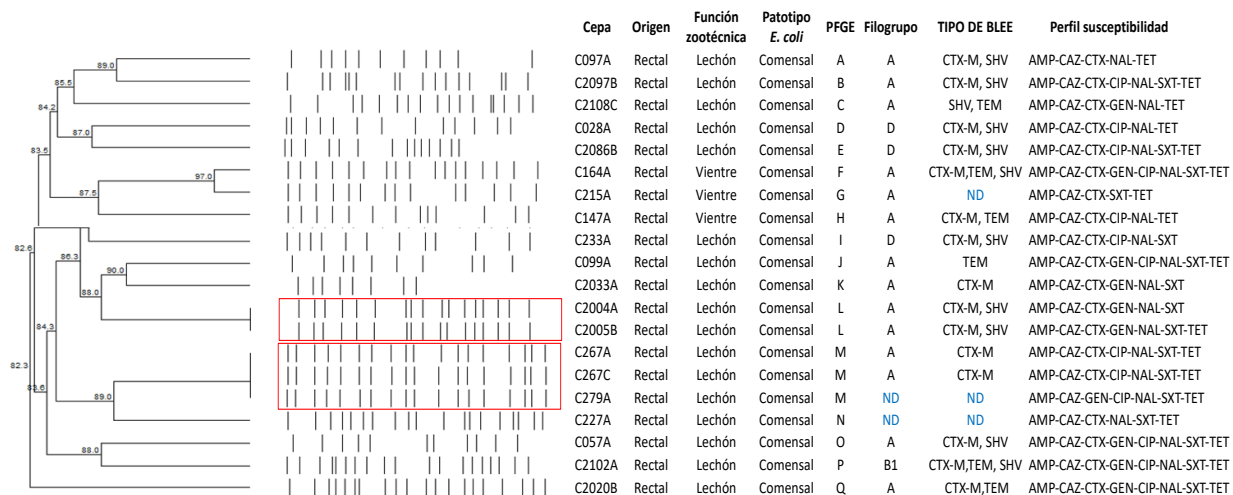
11.3 Relación clonal entre cepas de *Escherichia coli*.

El análisis por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) reveló 41 pulsotipos distintos entre 51 cepas de *E. coli* analizadas (Figura 8).

En cerdos se identificaron 20 pulsotipos (39.21%), con dos clonas predominantes (Figura 8A):

- **Clona L:** con dos clonas con el mismo patrón, es decir, dos cepas idénticas.
- **Clona M:** con tres clonas que compartieron el mismo patrón de bandas.

A



B

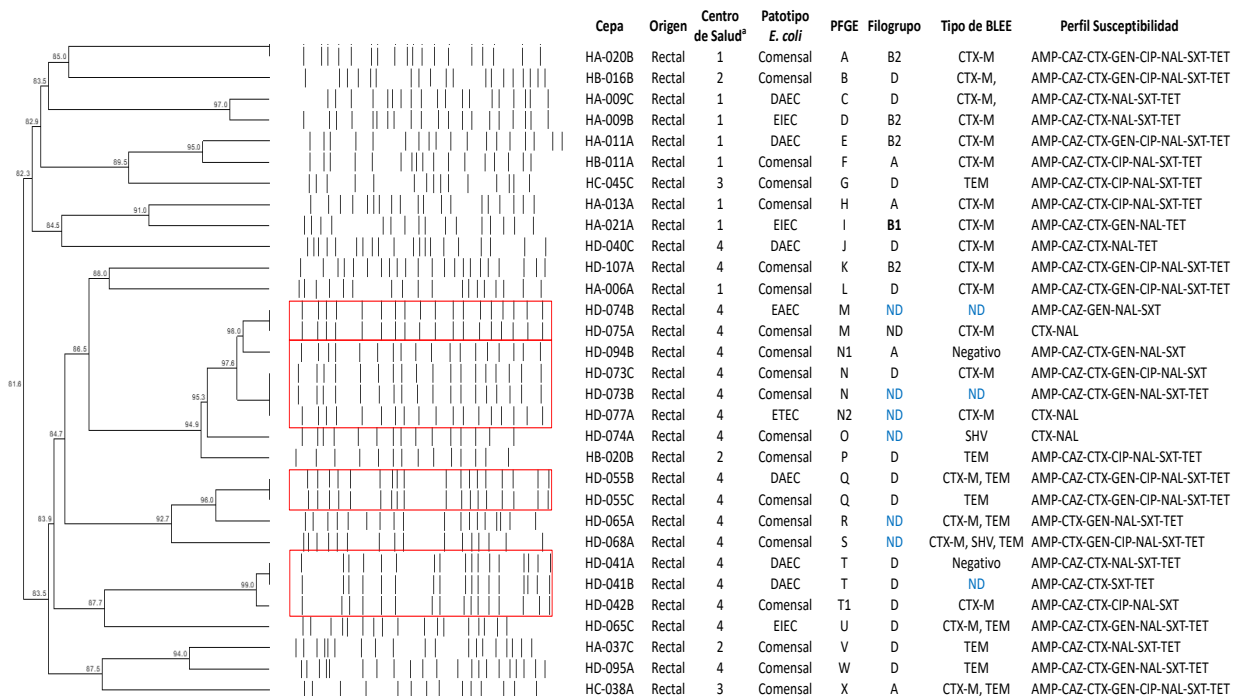


Figura 17. Dendrograma de la relación clonal de cepas representativas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos (A) y humanos (B). ^a=Centros de Salud de obtención de muestras en Jiutepec, Morelos: **1**-CS Jiutepec, **2**-CS Huizachera, **3**- CS Calera Chica, **4**-Hospital General de Cuernavaca “Dr José G. Parres, Cuernavaca, Morelos. **ND**= No determinado. Antibióticos analizados: **AMP** (Ampicilina), **CAZ** (Ceftazidima), **CTX** (Cefotaxima), **GEN** (Gentamicina), **CIP** (Ciprofloxacino), **NAL** (Ácido nalidíxico), **SXT** (Sulfametoxazol/Trimetoprim), **TET** (Tetraciclina).

En humanos se identificaron 27 pulsotipos (53%), con cuatro clonas mayoritarias (Figura (B):

- **Clona M:** con dos clonas con el mismo patrón.
- **Clona N:** con dos clonas y dos subclonas (N1 y N2) con patrones similares.
- **Clona Q:** con dos clonas con el mismo patrón (clonas idénticas).
- **Clona T:** con dos clonas y una subclona (T1) con patrones similares.

En general, la población humana presentó un alto grado de heterogeneidad genética, lo cual refleja una diversidad amplia de cepas circulantes, posiblemente influenciada por distintos factores epidemiológicos y fuentes de exposición. No se identificaron pulsos compartidos entre ambos hospedadores.

11.4. Filogrupos de *Escherichia coli* en humanos y cerdos.

En humanos, los filogrupos más comunes fueron D (48%), A (33%), B1 (11%) y B2 (8%) (Figura 9). En cerdos, el filogrupo A predominó con un 80%, seguido por D (16%) y B1 (4%). El filogrupo B2 no fue detectado en las cepas porcinas (Figura 10).

Hay diferencias puntuales entre hospedadores, el filogrupo A fue frecuente en ambos hospedadores, pero con una prevalencia significativamente mayor en cerdos (80% en cerdos vs. 33% en humanos). El filogrupo D, que es comúnmente asociado con cepas potencialmente patógenas, fue el más frecuente en humanos (48%), mientras que en cerdos su presencia fue menor (16%). El filogrupo B2, que está relacionado con cepas altamente virulentas y más comunes en infecciones extraintestinales humanas, solo se encontró en humanos (8%) y estuvo completamente ausente en cerdos. El filogrupo B1, que suele asociarse con cepas ambientales y comensales, estuvo presente en ambos hospedadores, pero con una mayor representación en humanos (11% en humanos vs. 4% en cerdos).

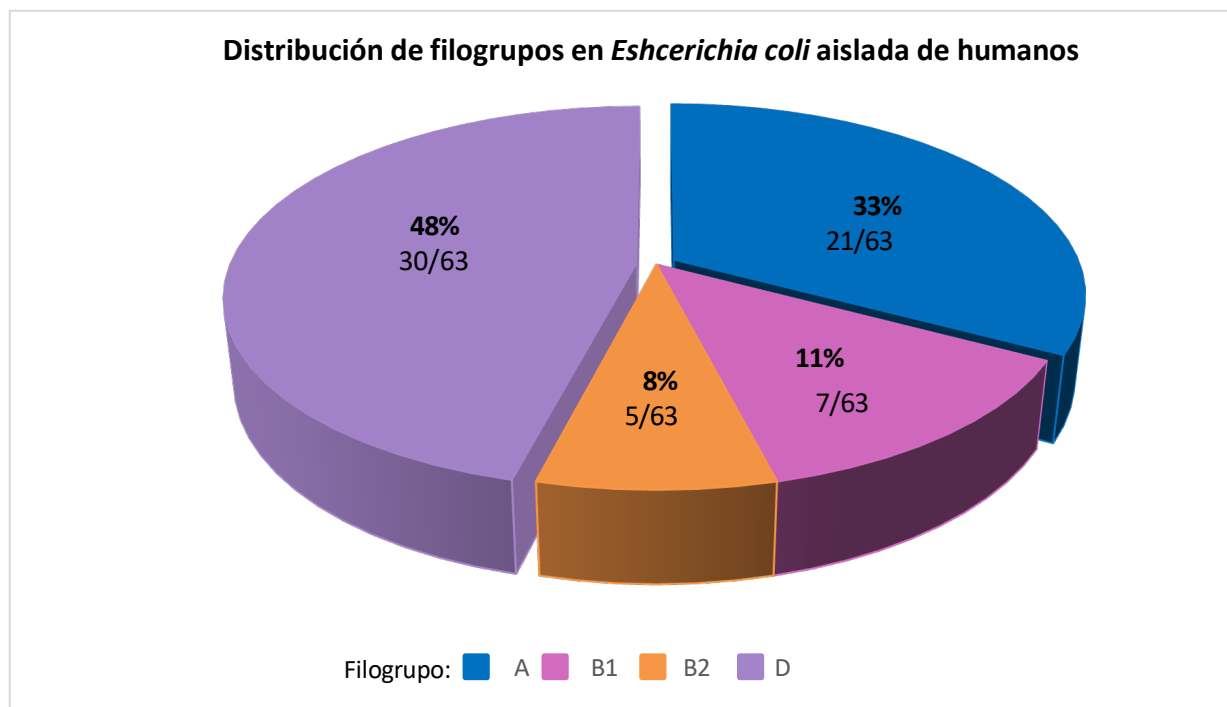


Figura 18. Distribución de filogrupos en aislamientos de *Escherichia coli* de origen humano ($n=63$). El filogrupo D fue el más prevalente (48%), seguido de A (33%), B1 (11%) y B2 (8%).

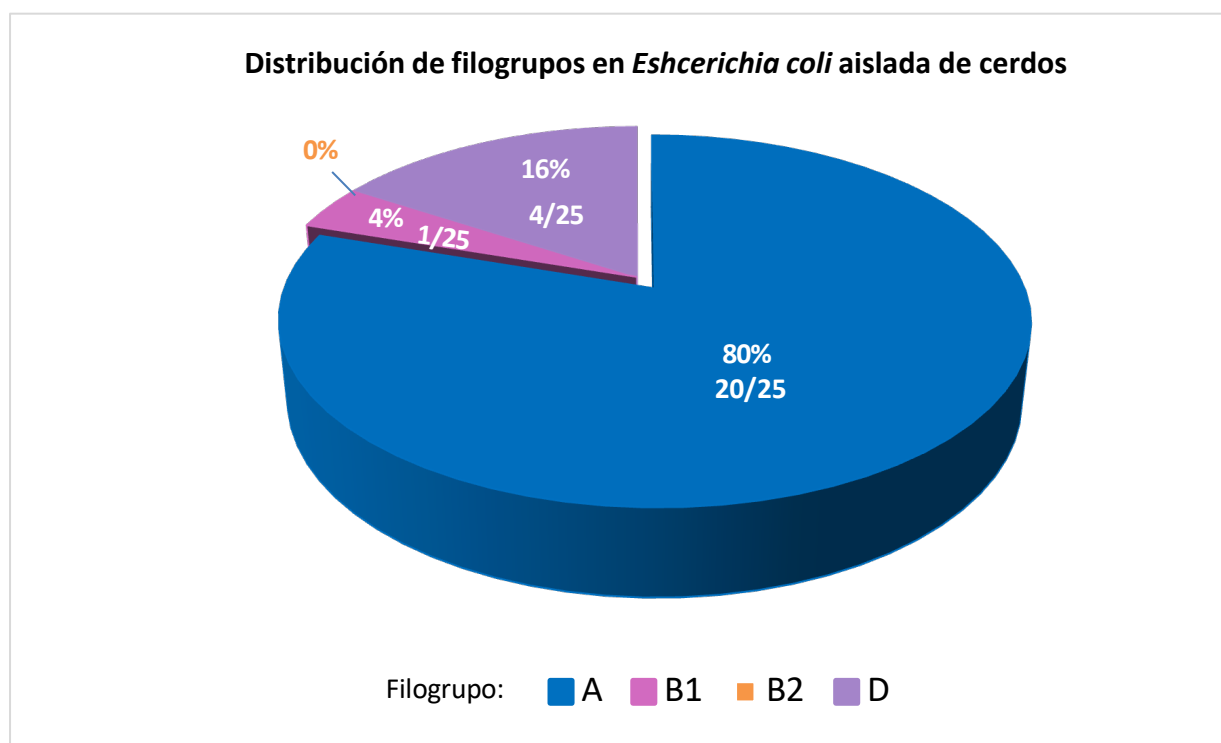


Figura 19. Distribución de filogrupos en aislamientos de *Escherichia coli* de origen porcino ($n=25$). El filogrupo A fue el más prevalente (80%), seguido de D (16%) y el B1 (4%).

11.5 Determinación del perfil plasmídico

El análisis del perfil plasmídico de *Escherichia coli* aislada de humanos y cerdos, realizado mediante el método de Kaiser, reveló diferencias en la diversidad y distribución de plásmidos entre ambas poblaciones. El perfil plasmídico en aislamientos de humanos revela que la mayoría presentaron entre uno y tres plásmidos (62%, 39/63), con un tamaño predominante de aproximadamente 66 kb. Un 33.5% (21/63) de los aislamientos contenía plásmidos pequeños (<7 kb). Solo un 2% (1/63) de los aislamientos no presentó plásmidos detectables (Figura 11). En el perfil plasmídico de los aislamientos de cerdos, se observó una mayor diversidad en el número de plásmidos, con presencia de aislamientos que contenían hasta 9 plásmidos. El 56% (14/25) de los aislamientos presentó entre uno y tres plásmidos, con un tamaño predominante de 66 kb, similar al observado en humanos. Un 52% de los aislamientos también presentó plásmidos pequeños (<7 kb) (Figura 12).

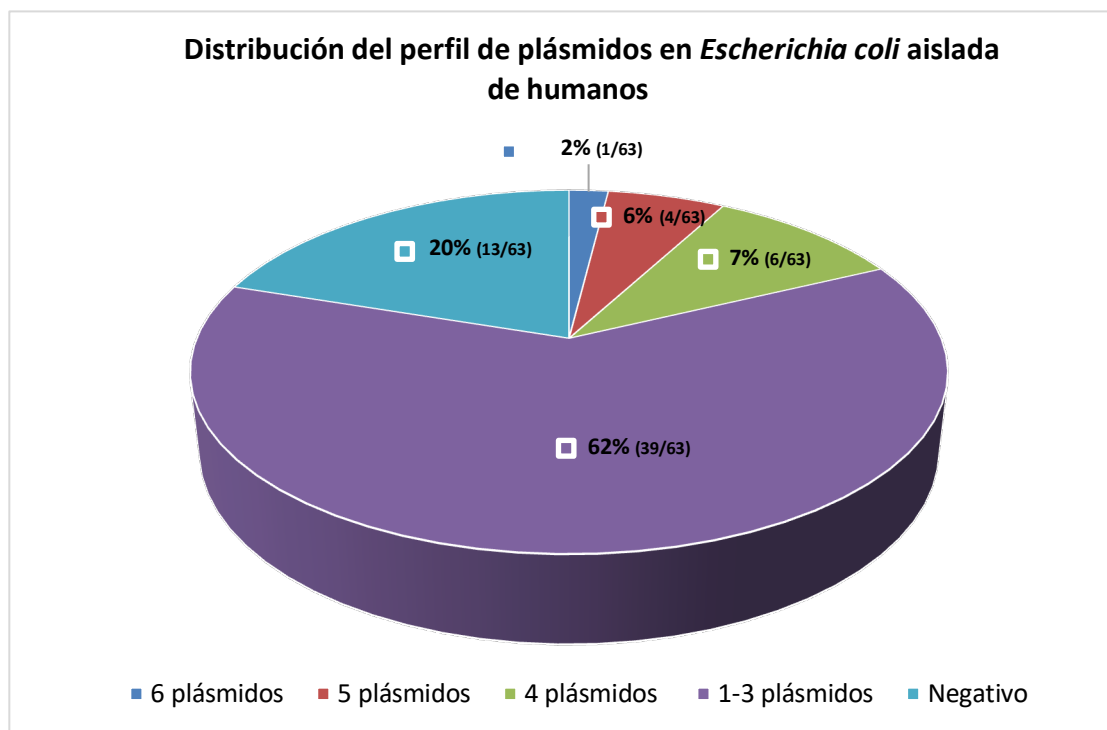


Figura 11. Distribución del perfil plasmídico en aislamientos de *Escherichia coli* de humanos.

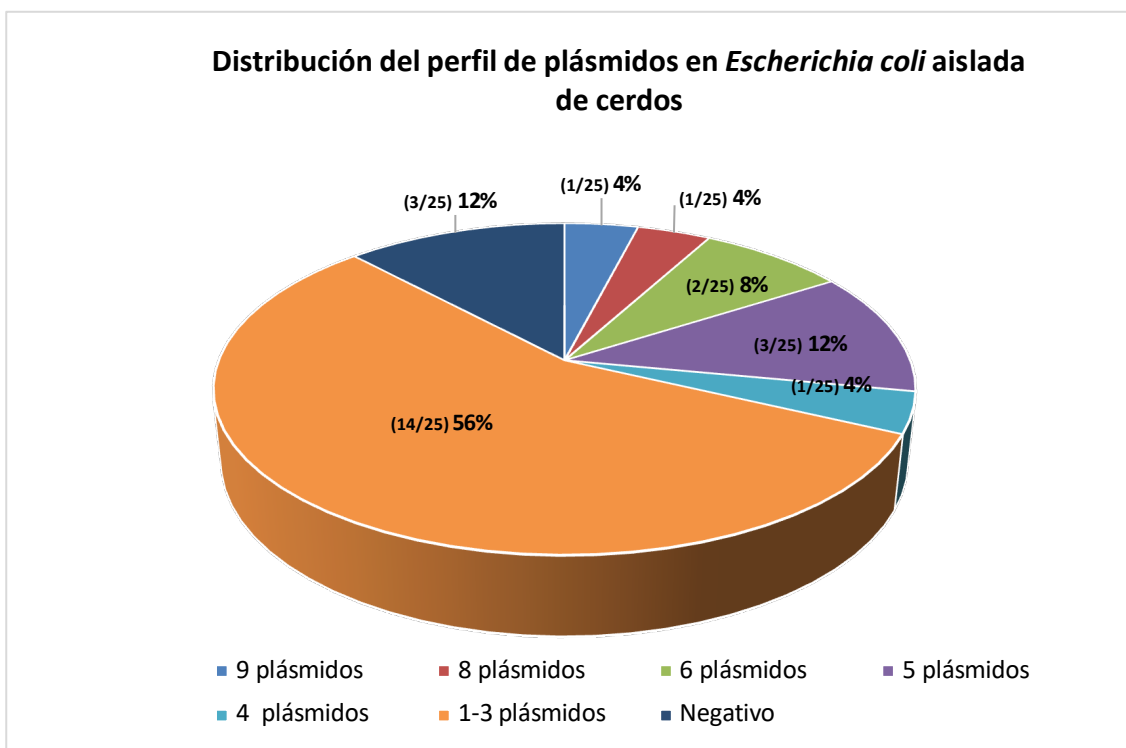


Figura 12. Distribución del perfil plasmídico en aislamientos de *Escherichia coli* de cerdos.

12. DISCUSIÓN

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública global a nivel mundial. El uso insuficiente, excesivo e incorrecto de los antibióticos ha provocado la propagación de microorganismos resistentes y multirresistentes en seres humanos, animales y el medio ambiente.

La ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX), ambas cefalosporinas de tercera generación se utilizan para tratar infecciones por bacterias gramnegativas en humanos y se consideran antimicrobianos de importancia crítica en la medicina humana según la Organización Mundial de la Salud, 2018 [OMS, 2018]. En consecuencia, los niveles preocupantes de resistencia a estas cefalosporinas han tenido mayor atención en estudios epidemiológicos moleculares en bacterias recuperadas de humanos [Castillo, et al., 2022]. Aunque la documentación precisa sobre la resistencia a cefalosporinas de tercera generación es limitada en animales destinados al consumo humano, como los cerdos, se sabe que estos animales pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a los antimicrobianos (RAM) o de bacterias resistentes a estas clases de antimicrobianos, y la posible diseminación de genes de RAM o bacterias resistentes de los cerdos a los humanos es una amenaza continua para la salud pública [Hayer et al., 2022].

En el Estado de Morelos, los antibióticos utilizados en la producción porcina para el tratamiento de infecciones por *E. coli* en particular y bacterias gramnegativas en general incluyen quinolonas (ciprofloxacina y enrofloxacin, un precursor del ácido nalidíxico), aminoglucósidos (gentamicina), pero no se tiene información sobre el uso de C3G (ceftazidima y cefotaxima). Todos clasificados por la OMS y la OIE de importancia crítica, tanto en medicina humana como en veterinaria [OMS, 2018; OIE, 2021].

En este estudio, una de las resistencias que destacó fue la de las C3G en cerdos; esto pone de manifiesto un problema emergente en este modelo de animales de granja. La mayor prevalencia de resistencia en los cerdos se observó en la doble resistencia (96%, CTX/CAZ) con una baja frecuencia de resistencia a CAZ (4%), sugiriendo que el uso insuficiente, excesivo e incorrecto de estos antimicrobianos puede influir en la aparición de cepas resistentes de *E. coli*. En contraposición, Faccone *et al.* (2019) obtuvieron 64.7% de resistencia a CTX y Gómez *et al.* (2022),

reportan 41.3% de resistencia a CTX. En ambos estudios, se observó un alto porcentaje de aislamientos resistentes a CTX, pero nosotros tuvimos una resistencia mayor. La doble resistencia observada en humanos (79.37%, CTX/CAZ) y la resistencia a CAZ (20.63%) fue muy similar a la reportada en un estudio en Argentina donde determinaron la resistencia a estas C3G en aislamientos clínicos de *E. coli* [Gramundí *et al.*, 2023]. Un estudio en Irak informó de una alta resistencia de *E. coli* a CTX (79.3%), igual a la reportada en este estudio y una resistencia a CAZ (68.3%), mucho mayor que la encontrada [Jalil *et al.*, 2022]. En República Democrática del Congo se encontró una alta resistencia de *E. coli* a la ceftazidima (65%) [Mfoutou *et al.*, 2021]. En consecuencia, la resistencia de *E. coli* a estos antibióticos podría deberse a la presencia de BLEE que son capaces de hidrolizar estos fármacos. Por lo tanto, es importante realizar una vigilancia molecular de *E. coli* aislada de la interfaz salud humana-animal [Mfoutou *et al.*, 2021].

Estudios recientes han indicado que la resistencia a C3G, especialmente la mediada por β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), es una preocupación mundial en humanos y animales de producción [Pietsch *et al.*, 2018, Sauget *et al.*, 2023]. Los individuos muestreados no procedían de pacientes hospitalizados, sino de infecciones adquiridas en la comunidad. Estos datos sugieren que la resistencia a C3G se está extendiendo fuera del entorno humano a la granja porcina. Estudios anteriores han sugerido que la presencia de resistencia a los betalactámicos en animales destinados al consumo indica que estos animales pueden servir como reservorio de genes de resistencia dentro de elementos móviles. Estos hallazgos proponen que las bacterias resistentes podrían transferirse a los humanos a través del contacto directo o la cadena alimentaria [Dang *et al.*, 2018]. Por lo tanto, es poco probable que la selección de la resistencia se haya producido en la granja, lo que corrobora los resultados de la multiclonación, ya que la selección en un entorno cerrado como una granja favorecería la propagación clonal.

Nuestros resultados coinciden con Faccone *et al.* (2019) y Gómez *et al.* (2022), quienes describieron que la resistencia a C3G en cepas de *E. coli* de origen porcino está asociada al gen *blaCTX-M*.

En el análisis de la prevalencia de BLEE en cepas de *Escherichia coli* aisladas de humanos y cerdos, destacó la alta proporción de aislamientos con fenotipo BLEE+, siendo del 67% en humanos y del 92% en cerdos. Esta diferencia puede estar

relacionada con variaciones en el uso de antimicrobianos entre sectores, así como con diferentes presiones selectivas en los ambientes humano y veterinario. En ambos hospedadores, el gen *blaCTX-M* fue el más prevalente, lo que refuerza su papel como principal mecanismo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación. En humanos predominó el perfil *blaCTX-M* > *blaTEM* > *blaSHV* (44.5%, 27%, 4.76%), mientras que en cerdos se observó una distribución *blaCTX-M* > *blaSHV* > *blaTEM* (76%, 52%, 36%). Esta diferencia en la frecuencia relativa sugiere presiones de selección distintas entre los reservorios.

La tasa de prevalencia general para los genes de resistencia fue del 53.41% para *blaCTX-M*, 29.55% para *blaTEM* y 18.18% para *blaSHV*. Nuestros resultados son comparables con los de Chandramohan *et al.* (2012), quienes reportaron prevalencias de 74%, 27% y 24%, respectivamente, para los mismos genes, y con Dirar *et al.* (2020), quienes encontraron en aislamientos humanos proporciones similares para *blaCTX-M* (38%), *blaTEM* (37%) y *blaSHV* (2%), pero son menores con los de Altayb *et al.* (2021), que informan las tasas de prevalencia para estos genes de 75%, 61%, 38% respectivamente. En cerdos, nuestros resultados se asemejan a los reportados en granjas porcinas de Latvia, donde se observaron prevalencias de *blaCTX-M* (86%), *blaTEM* (94%) y *blaSHV* (48%), aunque en nuestro estudio la frecuencia de *blaTEM* fue menor [Gāliņa *et al.*, 2021].

Se ha descrito que algunas variantes del gen *blaCTX-M*, comúnmente asociadas a resistencia a cefotaxima, pueden adquirir mutaciones puntuales que expanden su espectro de actividad e incluso conferir resistencia adicional a ceftazidima [Palzkill, 2018]. Esta característica podría explicar el fenotipo BLEE observado en cepas resistentes tanto a cefotaxima como a ceftazidima en nuestra población de estudio.

Por otra parte, las cepas de *E. coli* que no amplificaron para los genes *blaCTX-M*, *blaSHV* y *blaTEM-1* podrían portar otros mecanismos de resistencia como las β -lactamasas tipo AmpC. Estas enzimas, cuya expresión puede ser cromosómica o plasmídica, son capaces de hidrolizar cefalosporinas y no son inhibidas por compuestos como el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Esto representa un riesgo adicional, ya que la diseminación de genes *blaAmpC* también puede ocurrir mediante elementos genéticos móviles, aumentando la complejidad del tratamiento de infecciones causadas por estas cepas [Singh *et al.*, 2019].

La diversidad genética observada en los perfiles de PFGE evidencia una alta heterogeneidad entre las cepas de *E. coli* analizadas. En humanos se identificaron múltiples pulsotipos y al menos cuatro clonas mayoritarias (M, N, Q y T), algunas con subclonas relacionadas, lo que indica circulación simultánea de cepas con perfiles genéticos similares. En cerdos se detectaron dos clonas predominantes (L y M), pero no se encontraron pulsotipos compartidos entre ambos hospedadores. Esto sugiere una circulación independiente de cepas resistentes en cada reservorio. No obstante, la posibilidad de transmisión horizontal de genes de resistencia no puede descartarse, especialmente considerando la presencia de plásmidos y elementos genéticos móviles asociados a *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV*.

En el análisis comparativo de filogrupos, se observaron diferencias notables entre los aislamientos de *E. coli* de humanos y cerdos. En los cerdos, predominó el filogrupo A (80 %), comúnmente asociado con cepas comensales adaptadas a la microbiota intestinal de animales de producción, lo cual concuerda con estudios previos que lo han identificado como el más frecuente en reservorios animales [García-Meniño *et al.*, 2018]. En humanos, este grupo fue menos prevalente (33 %), aunque algunas cepas del filogrupo A pueden adquirir factores de virulencia y resistencia, aumentando su potencial patogénico [Clermont *et al.*, 2019].

El filogrupo D fue el más frecuente en humanos (48 %) y mucho menos común en cerdos (16 %). Este grupo ha sido asociado con cepas patógenas extraintestinales, lo que sugiere una posible especialización hacia el hospedador humano y un mayor riesgo clínico [Johnson *et al.*, 2019]. Por su parte, el filogrupo B2, relacionado con infecciones del tracto urinario y bacteriemias humanas, se detectó exclusivamente en humanos (8 %), reforzando su adaptación al entorno humano [Tenaillon *et al.*, 2010]. El filogrupo B1 fue más frecuente en humanos (11 %) que en cerdos (4 %), a pesar de que suele asociarse a cepas ambientales o animales silvestres [Escobar-Páramo *et al.*, 2006].

En comparación con otros estudios, como el de [Haghighatpanah *et al.*, 2022], en el que se identificó una prevalencia elevada del filogrupo B2 (64.6 %) y D (22.7 %) en aislamientos clínicos humanos, nuestros resultados muestran una distribución diferente, con mayor representación del filogrupo D (48 %) y menor del B2 (8 %). Estas diferencias podrían deberse a variaciones geográficas, al origen clínico o

comensal de las muestras, o al método de detección de los subgrupos filogenéticos. No obstante, ambos estudios coinciden en que los filogrupos D y B2 tienen una alta relevancia clínica por su asociación con cepas virulentas productoras de BLEE.

En conjunto, la distribución diferencial de los filogrupos entre humanos y cerdos observada en este estudio sugiere una separación ecológica de las cepas, aunque no excluye la posibilidad de transferencia horizontal de genes de resistencia. La presencia de filogrupos potencialmente patogénicos en humanos, especialmente D y B2, refuerza la importancia de la vigilancia epidemiológica para prevenir la propagación de cepas multirresistentes entre reservorios.

En la determinación del perfil plasmídico de *E. coli* aislada de humanos y cerdos encontramos diversidad en el tamaño de los plásmidos predominando un plásmido de aproximadamente 66kb en los aislados de humanos y cerdos, de acuerdo con lo reportado en el 2021 para el gen *blaCTX-M* este se encuentra con frecuencia en plásmidos de un tamaño que oscila entre 40kb y 180kb esto pudiera relacionarse a que la resistencia a betalactámicos particularmente la resistencia a cefalosporinas de tercera generación asociadas al gen *blaCTX-M* pudieran encontrarse en este gen de aproximadamente 66kb; Por otra parte en ambos aislados se identificaron plásmidos pequeños, siendo estos más prevalentes en los aislados de cerdos esto podría estar relacionado con el uso de antibióticos en la industria pecuaria, especialmente en lechones, donde la administración masiva de antibióticos y sin regulación favorece a la selección y proliferación de cepas bacterianas resistentes que portan plásmidos con genes de resistencia. Este ambiente de alta presión selectiva, combinado con las condiciones de cría de los cerdos, crea un entorno propicio para la diseminación y adaptación de estas cepas resistentes. La presencia de plásmidos en los aislados porcinos puede facilitar aún más la transferencia horizontal de genes de resistencia entre diferentes especies bacterianas, amplificando el riesgo de diseminación de la resistencia antimicrobiana. Sin embargo, se requiere concluir con la secuenciación de genoma completo de los aislados de *E. coli* de cerdos y humanos para saber el flujo de la resistencia a los antibióticos, así como la probable diseminación de estos plásmidos [Tran *et al.*, 2021].

En conjunto, estos hallazgos evidencian la necesidad de monitorear la transferencia

horizontal de genes de resistencia entre cepas de diferentes hospedadores, particularmente en el contexto de zoonosis y la circulación de factores genéticos entre reservorios animales y humanos. Esta situación refuerza la urgencia de implementar estrategias de vigilancia integradas bajo el enfoque de Una Sola Salud, con el fin de controlar la propagación de cepas multirresistentes (MDR) y preservar la eficacia de los antimicrobianos en ambientes compartidos por humanos y animales.

13. CONCLUSIÓN

1. Se confirmó una alta prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE tanto en humanos como en cerdos, con una mayor proporción relativa en los aislamientos porcinos.
2. Los genes *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaSHV* fueron los principales mecanismos de resistencia detectados, con una distribución diferencial entre hospedadores. *blaCTX-M* predominó en ambos, mientras que *blaSHV* y *blaTEM* fueron más frecuentes en cepas porcinas, lo que sugiere posibles diferencias en la presión selectiva.
3. Las cepas presentaron una alta diversidad genética sin identificación de clonas compartidas entre humanos y cerdos, lo que indica una circulación independiente, aunque no se descarta la posible transmisión horizontal de genes de resistencia.
4. El filogrupo D predominó en humanos, asociado a cepas potencialmente patógenas, mientras que el filogrupo A fue dominante en cerdos, consistente con cepas comensales. Esta distribución refleja diferencias ecológicas y posibles rutas de transmisión.
5. Los hallazgos obtenidos respaldan la necesidad de reforzar las medidas de bioseguridad y el uso racional de antibióticos en la producción animal, así como de establecer sistemas de vigilancia epidemiológica articulados entre los sectores humano y veterinario, en concordancia con el enfoque de Una Sola Salud.

14. REFERENCIAS

14.1 Referencias Bibliográficas

- Altayb HN, Siddig MA, El Amin NM, Mukhtar MM. (2021). Prevalence of blaCTX-M, blaTEM, and blaSHV genes among extended-spectrum β -lactamases-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae in different regions of Sudan. *Sudan J Med Sci*, 16(1):5–16.
- Calderón RG y Aguilar UL. (2016) Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev Med Cos Rica Cen*, 73(621):757-763.
- Camacho Silvas LA. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual [Bacterial resistance, a current crisis.]. *Rev Esp Salud Publica*. 97:e202302013. Spanish.
- Carlos Marquez, M., Barrera Escorcía, G., Díaz Larrea, J. (2019). Mecanismos de patogenicidad de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* *Contactos, Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería*, (113): 5-17. Recuperado a partir de <https://contactos.izt.uam.mx/index.php/contactos/article/view/16>
- Castillo AK, Espinoza K, Chaves AF, Guibert F, Ruiz J, Pons MJ. (2022). Antibiotic susceptibility among non-clinical *Escherichia coli* as a marker of antibiotic pressure in Peru (2009- 2019): one health approach. *Heliyon*, 8(9): e10573. doi: 10.1016/j.heliyon. 2022.e10573.
- Chandramohan L, Revell PA. (2012). Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a pediatric patient population. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(9):4765–70. doi: 10.1128/AAC.00666-12.
- Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, Denamur E, Gordon D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol*. 21(8):3107-3117. doi: 10.1111/1462-2920.14713.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*, 66(10):4555-8. doi: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*, 5(1):58-65. doi: 10.1111/1758-2229.12019.

- CLSI. (2023). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cooney CA. (1992). Separation and Size Determination of DNA over a 10-,200 kbp Range. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 12, 31–37. <https://doi.org/10.1385/0-89603-229-9:31>.
- Cué-Brugueras M, Morejón-García M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr* [Internet]. 14(4): 347-361.
- Dang STT, Bortolaia V, Tran NT, Le HQ, Dalsgaard A. (2018). Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from farm workers and pigs in northern Vietnam. *Trop Med Int Health* 23(4): 415-424; doi: 10.1111/tmi.13054
- Dirar MH, Bilal NE, Ibrahim ME, Hamid ME. (2020). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and molecular detection of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genotypes among Enterobacteriaceae isolates from patients in Khartoum, Sudan. *Pan Afr Med J*, 37:213. doi: 10.11604/pamj.2020.37.213.24988.
- Escobar-Páramo P, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Rahimy MC, Andreumont A, Denamur E, Ruimy R. (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 72(9):5698-5700. doi: 10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004.
- Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA, Vargas-Remolina LV. (2016) Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chil Infectol [online]*, 33(4):438-450. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>.
- Faccone D, Rapoport M, Albornoz E, Celaya F, De Mendieta J, De Belder D, Lucero C, Gomez S, Danze D, Pasteran F, Corso A; Mobilizable Colistin Resistance Group. 2020. Plasmidic resistance to colistin mediated by *mcr-1* gene in *Escherichia coli* clinical isolates in Argentina: A retrospective study, 2012–2018. *Rev Panam Salud Publica*, 44:e55. doi: 10.26633/RPSP.2020.55.
- Figueroa-Bossi N, Balbontín R, Bossi L. (2022). Preparing Plasmid DNA from Bacteria. *Cold Spring Harb Protoc*, 2022(10):Pdb.prot107852. doi: 10.1101/pdb.prot107852.
- Gāliņa, D, Balins A, Valdovska A. (2021). The Prevalence and Characterization of Fecal Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Pigs on Farms of Different Sizes in Latvia. *Antibiotics* (Basel), 10(9):1099. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091099>

- García-Meniño, I., Lumbreras, P., & Blanco, J. (2018). Characterization of *Escherichia coli* from pigs with postweaning diarrhea in Spain: High prevalence of enterotoxigenic strains, antimicrobial resistance and certain clones commonly found in human extraintestinal infections. *Vet Microbiol*, 225, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.016>
- Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, Martínez-Romero E. (2009) Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica Mex*, 51(Suppl. 3):S439-446. doi: 10.1590/s0036-36342009000900009
- Gómez, M. F., Vinocur, F., Rodríguez Ramos, S., Garassino, B. J., Nievas, H. D., Nievas, V. F., Alarcón, L. V., Armocida, A. D., Pérez, E. M., Griffo, D., Giacoboni, G. I., & Moredo, F. A. (2022). Aislamientos de *Escherichia coli* de origen porcino resistentes a antimicrobianos de importancia crítica para la salud pública. *Analecta Veterinaria*, 42(2):067. Doi: 10.24215/15142590e067
- Gonzalo-de-Liria CR. (2005). Antibióticos I. *An Pediatr Contin*. 3(1): 1-9.
- Gramundi I, Albornoz E, Boutureira M, Rapoport M, Gomez S, Corso A, Castro G, Faccone D. (2023). Characterization of third generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates from Ushuaia, Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 55(1):43-48. doi: 10.1016/j.ram.2022.06.002.
- Haghighatpanah M, Zeighami H, Mozaffari Nejad AS, Hajipour N. (2022). Phylogenetic groups and antimicrobial resistance characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from clinical samples in North Iran. *Arab Journal of Gastroenterology*. 23(2):102-107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajg.2022.02.003>.
- Hannaoui Rodríguez EJ, Villalobos LB, Martínez Nazaret RE. (2009) *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1): 13-20.
- Hayer SS, Casanova-Higes A, Paladino E, Elnekave E, Nault A, Johnson T, Bender J, Perez A, Alvarez J. (2022). Global Distribution of Extended Spectrum Cephalosporin and Carbapenem Resistance and Associated Resistance Markers in *Escherichia coli* of Swine Origin - A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Microbiol*, 13:853810. doi: 10.3389/fmicb.2022.853810.
- Jalil MB, Al Atbee MYN. (2022). The prevalence of multiple drug resistance *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infections. *J Clin Lab Anal*, 36(9):e24619. Doi: 10.1002/jcla.24619
- Johnson TJ, Elnekave E, Miller EA, Munoz-Aguayo J, Flores Figueroa C, Johnston B, Nielson DW, Logue CM, Johnson JR. (2018). Phylogenomic Analysis of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Sequence Type 1193, an

- Emerging Multidrug-Resistant Clonal Group. *Antimicrob Agents Chemother.* 63(1):e01913-18. doi: 10.1128/AAC.01913-18.
- Kiesser T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12(1):19-36. doi: 10.1016/0147-619x(84)90063-5.
- Marrero-Moreno C, Mora-Llanes M, Hernández-Fillor RE, Báez-Arias M, García-Morey T, Espinosa-Castaño I. (2017). Identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia Matanzas. *Rev Salud Anim* [online]. 39(3):1-15.
- Martínez-Martínez L, Calvo J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enf Infec Microbiol Clín.* 28(S4):4-9.
- Mfoutou Mapanguy CC, Adedaja A, Kecka LGV, Vouvoungui JC, Nguimbi E, Velavan TP, Ntoumi F. (2021). High prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in Congolese students. *Int J Infect Dis.* 103:119–23. Doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.1441
- Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. (2011) Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana Medicina Experimental Salud Publica*, 28(4):648-56.
- Murillo-Nájera FJ. (2020, abril 15). Resistencia bacteriana una crisis actual. *Med-Galenus*. <https://www.med-cmc.com/articulos/resistencia-bacteriana-una-crisis-actual>
- Palzkill T. (2018) Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. *Front Mol Biosci.* 5:16. doi: 10.3389/fmolb.2018.00016.
- Pérez-Cano HJ, Robles-Contreras A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev Med MD.* 4.5(3):186-191.
- Pietsch M, Eller C, Wendt C, Holfelder M, Falgenhauer L, Fruth A, Grössl T, Leistner R, Valenza G, Werner G, Pfeifer Y; RESET Study Group. Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. *Vet Microbiol.* 2017 Feb;200:130-137. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.11.028.
- Puerta-García A, Mateos-Rodríguez F. (2010) Enterobacterias. *Medicine.* 10(51): 3426-3431. Doi : [https://10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](https://10.1016/S0304-5412(10)70056-1)
- Quintero-Hernández V. (2021) La próxima pandemia: Bacterias multirresistentes

- a antibióticos. *Revista Alianzas y Tendencias BUAP*. 6(21):1-7. DOI: <https://eoi.citefactor.org/10.11235/BUAP.06.21>
- Ríos-Muñiz D, Cerna-Cortés JF, Morán-García N, Meza-Segura M, Estrada-García T. (2019) *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos muridos. *Gac Méd Mex*. 155(4), 410-416. Doi: <https://doi.org/10.24875/gmm.18004716>.
- Rivera L.G., Motta P.A., Cerón M.F. y Chimonja F.A. (2012) Resistencia de la *Salmonella* a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. *Rev. CES Med. Vet. Zootec.*; Vol. 7(1):115-129.
- Rodríguez-Angeles G. (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli* [Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*]. *Salud Publica Mex*. 44(5):464-75. Spanish.
- Saenz S.A., Torres M.I. y López D.P. (2022) Genes y expresión de factores de virulencia en *Escherichia coli* aislada en animales de producción. *Revista Ciencia y Agricultura*, Vol.19(2): 64-76.
- Sauget M, Atchon AK, Valot B, Garch FE, Jong A, Moyaert H, Hocquet D; EASSA and VetPath Study Group. Genome analysis of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* species recovered from healthy and diseased food-producing animals in Europe. *PLoS One*. 2023 Oct 26;18(10):e0289829. doi: 10.1371/journal.pone.0289829.
- Singh T, Singh PK, Das S, Wani S, Jawed A, Dar SA. (2019) Transcriptome analysis of beta- lactamase genes in diarrheagenic *Escherichia coli*. *Sci Rep*. Vol. 6;9(1):3626. doi: 10.1038/s41598-019-40279-1.
- Suárez C. y Gudíol F. (2009) Antibióticos betalactámicos. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol.27(2):116-129.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 33(9):2233-9. doi: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995.
- Tran TT, Scott A, Tien YC, Murray R, Boerlin P, Pearl DL, Liu K, Robertson J, Nash JHE, Topp E. (2021) On-Farm Anaerobic Digestion of Dairy Manure Reduces the Abundance of Antibiotic Resistance-Associated Gene Targets and the Potential for Plasmid Transfer. *Appl Environ Microbiol*. Vol.87(14): e0298020.

doi: 10.1128/AEM.02980-20.

Vila J. y Zboromyrska Y. (2012) Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. *Revista Gastroenterología y Hepatología*; Vol.35(2): 89-93.

14.2 Fuente Electrónica

CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades). (2022). About antimicrobial resistance. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>

CDC (2020) Information on antibiotic use and antibiotic resistance. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/antibiotic-resistance.html>

CDC (2019) Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Ground Beef. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/o103-04-19/index.html>

CDC (2014) *Escherichia coli* (*E. coli*). Recuperado de: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2020). Antimicrobial Resistance. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2018). Revisión de la lista OMS de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana (6.a ed.). Recuperado de: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/331531/9789243515526-spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y>

OMS (2015) WHO report indicates that children under 5 years of age account for almost a third of deaths from foodborne diseases. Recuperado de: <https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>.

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2021. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. Disponible en: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/06/e-oie-lista-antimicrobianos-junio2021.pdf>

SINAVE. (2024). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. (2025, marzo 25). Boletín Epidemiológico. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>.



D DE MEDICINA

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 05 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de

Medicina P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE Escherichia coli RESISTENTES A BETALACTAMICOS AISLADA DE UNA INTERFASE SALUD HUMANA-ANIMAL**, que para obtener el

grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jackeline Cerón López. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Elsa María Tamayo Legorreta



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

ELSA MARÍA TAMAYO LEGORRETA | Fecha:2024-12-06 14:52:45 | FIRMANTE

I1rTUzAzhhgAyt4MrEtxmRGgY04pgPuHtQrB50G3lAQyX8e+ApxsFu3AIEZrJLVJycJVbB0NJB+eV95yARanUMbDnW8bQL1WnkHU30mEo2gSCMtctzY0olWawTfKoL
TJuU5BBU

hFwgEuB4aT51EpGAUvGYECNp3G0AAtdpC3DOtd67FVg5Dxa/VGMZrlk525MWYYBRhErd1VqXflfqS6HE+FM2YtfoeepqiPBU821u61qOyXV8pgaQjNTti5H88nV1+d
9eikQ+89k GF0UaCfAozsCZ+FjMTm7ZqppMfbXqdC+MpeUMgW0ldUg6X3uYZfl82+fSrijvOo8NvUV0NygA==



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

07gTVDBjF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2KYqqzIKjC0hMPjiw2bYUvQF4He6WR3k>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



FACULTAD DE MEDICINA
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 05 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de

Medicina P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE Escherichia coli RESISTENTES A BETALACTAMICOS AISLADA DE UNA INTERFASE SALUD HUMANA-ANIMAL**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jackeline Cerón López. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER | Fecha:2024-12-13 14:06:44 | FIRMANTE

ryaX6CFk91BJPG3Vlx7Cpvc32lxsUwMuwyXMeZxhJCtT1mdF/kBxQdKfAvFu3JdTQErVaEFd7Xyxsgfmd+7w6OPJdGIONUIUD/Djlb7ADYcweUjMgcqG4XFCTtDITPa
Zz1ZQ6hH
Ou0+HppVblZzdS+wRfxrRZDhgQfP9Dv2/W4Y7ObELwyAcV/d86bZi39761lbt6Vaih9NxjAWdFz/TLkp6VGZeqlAYKpbc7u5JQ9cgCMBYeFwkTFlocmVL+ksS1jvrBEOov
tQc3bpYyj 52GBBmVX5SQFNC6eHnBxGwTCkTB3ylsno2JTMQGVaurvRrly9h1WUVDn0os91HrxCw==



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

[wp1tojRS9](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/lC2gzoDrg9wtKPqPILB8jEJ9DoC4ulsF>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



FACULTAD DE MEDICINA
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 05 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de

Medicina P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE Escherichia coli RESISTENTES A BETALACTAMICOS AISLADA DE UNA INTERFASE SALUD HUMANA-ANIMAL**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jackeline Cerón López. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2024-12-13 14:01:22 | FIRMANTE

qUmJWFjq5fcYw4poECJ9JMIURs9NRn4HV/h14itV9ra2LNTSS4rO52WfEfg6LZ1fVLSxrSkEJc9Ph6MFSCjOjlxlf35/LkrTG+LxEdbgmwd+Q8HZEsjWavYHtjS6G+VQ
GdPSUgld
pe8u4b0efQdb8pViPAcOLJif3Mf8D8LpkqWoC1BgKWEekFaNf+nNPRSJmNYcRZAaBGSWfvk+8Yc2/8tDoGFQvSY3xiVjUj8fROYMkAipOGnHpQRvPc/z4bsZX7WCt1
g+/YSkKgt DXjoZ+eLGr3d3zf1vOPxeRNOBany34mSNb1Brb47r7TJfcAYpkO4u9AoKNXnHm3Hp46A==



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

ICFLAMf1y

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zWDVFTcf8Lz0sIFTOIT2PkAdHM6sGnJf>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



FACULTAD DE MEDICINA
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 05 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de

Medicina P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE Escherichia coli RESISTENTES A BETALACTAMICOS AISLADA DE UNA INTERFASE SALUD HUMANA-ANIMAL**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jackeline Cerón López. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Celia Mercedes Alpuche Aranda



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

CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA | Fecha: 2024-12-06 14:50:33 | FIRMANTE

pA3nFWBfAb2W/OxCgs9rmhH9MNV5Qo1O7bVZhuFXPmtku3DEBo97xa44m4nL2Cy4rqWmKCDsyf665+8MSKB7AZ4bAFpQxsbluWOPFGaQpV1HQqbuqOkYswifVz/8BBsf5

maJB7GBJ6eJwrxjHCjn+Tha9WBy9ATIL35QUm2wUbQh9M3nJqHQkyfSUrIwfrSozg/1tCh311Y7wUj7hDlevKOJnqTbrEFgmD5bd8cXrsTOrpA44V5tVoE+if2/RenPpSpN0+hzZAQ-04+uLBNucOxCfmrn0qjdl3T1CiqBL7Bzetys/y5Gv6dSbXvLcOdEZ7/Y8/KSUK6XnTn1Kvg==



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

[TqpWJ6vAL](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IWXhHhHLQHHPFfNDsrt5VAiOATIVV8M1>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



FACULTAD DE MEDICINA
Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Morelos, 05 de diciembre de 2024.

Dr. Lorenzo Díaz Carrillo
Director de la Facultad de

Medicina P r e s e n t e

Estimado Dr. Díaz, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE Escherichia coli RESISTENTES A BETALACTAMICOS AISLADA DE UNA INTERFASE SALUD HUMANA-ANIMAL**, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Jackeline Cerón López. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Vera Lucia Petricevich



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

VERA LUCIA PETRICEVICH | Fecha:2025-01-15 08:40:36 | FIRMANTE

gdQl3RS4icaBTJCrXKN4w4m+cwYb+GD9xO+4YueYsNPqi+JTo4ddwLWMTIV0Yim2dZBqCJo4hyMyd8eO5ZqjJpB4rM6Om9Fhl3bkysnw/mK22Wt60I3jwsXoS509fy
VAMJnVZX

pW9s1Wyp2TxuziPga6hoo5WU/jYRzUASrK4gFj7wu4WHrlPiBdnQm7CxATXGSWEJmKOoh6d8zf7HyjPJBtgZvg1FLFqAFMT3JkXg4PIfZdqqa26DaTH4zWO9Ho1c7
CUUMoPp uKEb/eB4ulQBN/P5WKjHxXODUqXgigOKjYTKlee3+/sxEy3XQyjj+wNFxFM7QeJ+9DL4tSmNEA==



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

Bu1PTMfWQ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ShTMlpMlb6EB0fp3FEwxamX8MTBuW0Um>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

