



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA, INSTITUTO DE CIENCIAS



**CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS Y QUINOLONAS EN
CEPAS DE *Citrobacter* spp., Y *E. coli* DE ORIGEN ALIMENTARIO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

QFB. ENRIQUE HERNÁNDEZ ALONSO

DIRECTOR DE TESIS

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

PUEBLA, PUE.

DICIEMBRE, 2016

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	iv
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	v
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	vi
AGRADECIMINETOS PERSONALES.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Características generales de las enterobacterias.....	1
1.1. <i>Citrobacter</i> spp.....	1
1.2. <i>Escherichia coli</i>	2
1.2.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	2
1.2.2 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	3
1.2.3 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	4
1.2.4 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	4
1.2.5 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	4
1.2.6 <i>E. coli</i> difuso adherente (DAEC).....	5
1.3 Filogenia de <i>E. coli</i>	5
2. Antibióticos	5
2.1 Antibióticos β -lactámicos	5
2.1.1 Estructura química y clasificación	6
2.1.2 Mecanismo de acción.....	6
2.1.3. Resistencia a β -lactámicos	7
2.1.4. β -lactamasas.....	7
2.1.4.1 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	8
2.1.4.2 BLEE TEM.....	9
2.1.4.3 BLEE SHV.....	10
2.1.4.4 BLEE OXA.....	10
2.1.4.5 BLEE CTX-M.	10
2.1.4.6 BLEE AmpC.	11

2.1.4.6.1 β -lactamasas plasmídicas tipo AmpC.....	11
2.1.4.7 β -lactamasas con actividad carbapenemasa.....	12
3. Quinolonas	13
3.1 Clasificación de las quinolonas.....	13
3.2 Mecanismos de acción de las quinolonas.	14
3.3 Resistencia a quinolonas	14
3.3.1 Mecanismos de resistencia cromosómicos a quinolonas.	14
3.3.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos	15
3.3.2.1 Proteínas Qnr	15
3.3.2.2 Enzima Aac (6')-Ib-cr	15
3.3.2.3 Bomba de eflujo OqxAB	16
3.3.2.4 QepA.....	16
4. Aminoglucósidos	16
4.1 Mecanismo de acción.....	17
4.2 Mecanismos de resistencia	17
5. Tetraciclinas.....	17
5.1 Mecanismo de acción.....	18
5.2 Resistencia a tetraciclinas	18
5.2.1 Proteínas de eflujo	18
6. Plásmidos y la diseminación de la resistencia.....	18
6.1 Replicación	19
6.2 Clasificación plasmídica por grupos de incompatibilidad	19
6.2.1 Clasificación por grupo de incompatibilidad mediante tipificación de plásmidos por PBRT (PCR based replicon typing)	19
6.2.2 Tipificación de plásmidos basados en su movilidad.....	20
ANTECEDENTES	21
Antecedentes generales.....	21
Antecedentes específicos.....	23
Antecedente directo.	26
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
ESQUEMA DE TRABAJO	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30

Cepas bacterianas	30
Obtención de muestras	30
Aislamiento.....	30
Identificación bacteriana.....	31
Determinación de susceptibilidad a antimicrobianos.....	31
Fenotipo BLEE.....	33
Determinación del fenotipo BLEE en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.	34
Caracterización molecular de la resistencia.....	35
Extracción de ADN por el método de hervido.	36
Volumetría de los componentes usados en la PCR.....	36
Determinación del grupo filogenético en las cepas de <i>E. coli</i>	36
Determinación del patovar en las cepas de <i>E. coli</i>	38
Extracción de ADN genómico de las cepas de <i>E. coli</i>	40
Amplificación de genes BLEE.....	41
Caracterización del gen <i>bla</i> _{CMY-144} en la cepa de <i>Citrobacter freundii</i> BUAP385Cf.....	43
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	44
Amplificación de genes que codifican para β -lactamasas con actividad carbapenemasa.	44
Amplificación de genes involucrados en la resistencia a quinolonas.	45
Amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos, tetraciclina y cloranfenicol.....	47
Caracterización parcial de plásmidos.....	48
Método PBRT.	49
Método DPMT.....	50
Visualización de los productos de PCR.....	53
Purificación de los productos de PCR.....	53
Secuenciación de los genes amplificados	53
Análisis de las secuencias.....	53
Extracción plasmídica.....	53
Electroforesis en campos pulsados.	54
RESULTADOS	55
Objetivo 1. Aislar e identificar cepas de <i>Citrobacter</i> spp. y <i>E. coli</i> , a partir de muestras de leche, carne, verduras crudas y clínicas.....	55
Cepas bacterianas de <i>Citrobacter</i> spp.....	56
Cepas bacterianas de <i>E. coli</i>	57
Objetivo 2. Determinar el perfil de susceptibilidad a antibacterianos y caracterizar fenotípicamente la producción de BLEE.	58

<i>Citrobacter</i> spp.	58
<i>E. coli</i>	61
Fenotipo BLEE en aislados de <i>Citrobacter</i> spp.	62
Fenotipo BLEE en aislados de <i>E. coli</i>	63
Objetivo 3. Determinar el patotipo diarreagénico y realizar la clasificación filogenética de <i>E. coli</i>	64
Determinación del patotipo en las cepas de <i>E. coli</i>	64
Clasificación filogenética de <i>E. coli</i>	65
Objetivo 4. Identificar genes que codifican para las BLEE y β -lactamasas tipo AmpC.....	68
Amplificación de genes BLEE en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.....	68
Caracterización molecular de <i>bla</i> _{CMY} en la cepa BUAP385Cf	70
Amplificación y secuenciación del 16S ADNr de la cepa BUAP385Cf.....	70
Entorno genético de CMY-144	74
Perfil plasmídico en la cepa de <i>C. freundii</i> BUAP385Cf por Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE-S1).	76
Amplificación de genes BLEE en <i>E. coli</i>	76
Objetivo 5. Identificar genes que codifican para β -lactamasas con actividad carbapenemasa como IMP, GES y KPC en aquellas cepas resistentes a carbapenémicos.	80
Objetivo 6. Identificar mutaciones en genes cromosómicos (<i>parC</i> , <i>gyrA</i>) e identificar genes plasmídicos (<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , variante <i>acc(6')-Ib-cr</i> , <i>qepA</i> y <i>OqxA/B</i>) involucrados en la resistencia a quinolonas.....	80
Mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas en los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i>	81
Amplificación de genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas.....	82
Objetivo 7. Identificar genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol.....	84
Objetivo 8. Determinar el perfil plasmídico de algunas cepas multirresistentes de <i>Citrobacter</i> spp., y de <i>E. coli</i> y caracterizar parcialmente los plásmidos involucrados en la resistencia.	86
Caracterización parcial de plásmidos en <i>Citrobacter</i> spp.	86
Extracción plasmídica con miniprep para identificar la presencia de plásmidos	87
Caracterización parcial de plásmidos en las cepas de <i>E. coli</i>	88
DISCUSIÓN.....	94
CONCLUSIONES	102
PERSPECTIVAS	104
REFERENCIAS.....	105

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Antibióticos y puntos de corte evaluados en el presente trabajo en el antibiograma por Kirby-Baüer según el csi 2015 para enterobacterias	
2	Volumetría de los componentes de PCR	
3	Algoritmo para la asignación del grupo filogenético en <i>E. coli</i>	
4	Oligonucleótidos usados para realizar la clasificación filogenética	
5	Condiciones usadas para la amplificación de los genes como marcadores moleculares para la clasificación filogenética de <i>E. coli</i>	
6	Oligonucleótidos usados para la determinación del patovar diarreagénico en las cepas de <i>E. coli</i>	
7	Condiciones de las PCR para la amplificación de factores de virulencia	
8	Oligonucleótidos usados para la amplificación de genes BLEE en las cepas de <i>E. coli</i> y <i>Citrobacter spp</i>	
9	Condiciones de amplificación de genes BLEE	
10	Oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación del entorno genético de CMY en la cepa de <i>C. freundii</i> BUAP385Cf	
11	Condiciones utilizadas para la amplificación del entorno genético de CMY	
12	Oligonucleótidos usados para la amplificación de <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{KPC}</i> y <i>bla_{GES}</i>	
13	Condiciones de PCR para la amplificación de los de <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{KPC}</i> y <i>bla_{GES}</i>	
14	Oligonucleótidos usados para la amplificación de gene asociados a la resistencia a quinolonas	
15	Condiciones para la amplificación de genes involucrados en la resistencia a quinolonas	
16	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de <i>aac(3')-II</i> , <i>tet a/b</i> y <i>cmlA</i> en las cepas de <i>E. coli</i> y <i>Citrobacter spp.</i>	
17	Condiciones de amplificación de los genes <i>aac(3')-II</i> , <i>tet A/B</i> y <i>cmlA</i>	
18	Cepas seleccionadas de <i>Citrobacter spp.</i> , para la caracterización parcial de plásmidos	
19	Oligonucleótidos para el método PBRT	

20	Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de replicones por PBRT
21	Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los motivos MOB de las relaxasas en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.
22	Condiciones de PCR del método DPMT
23	Número de muestras y cepas recuperadas
24	Origen de aislamiento y especies de las cepas de <i>Citrobacter</i> .
25	Origen de aislamiento de las cepas de <i>E. coli</i> .
26	Fenotipo BLEE en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.
27	Determinación de filogrupos
28	Variantes de los genes que codifican para BLEE en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.
29	Variantes de CTX-M y TEM en las cepas de <i>E. coli</i> obtenidas por secuenciación.
30	Concentración mínima inhibitoria en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.
31	Origen y Fenotipo de resistencia a quinolonas en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp., y <i>E. coli</i>
32	Reporte de mutaciones en los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp., encontradas por análisis de secuencias
33	Reporte de mutaciones en los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> de las cepas de <i>E. coli</i> encontradas por análisis de secuencias
34	Cepas seleccionadas para amplificar los genes <i>aac(3')-II</i> , <i>tetA/B</i> y <i>cmlA</i>
35	Cepas de <i>Citrobacter</i> spp., seleccionadas para la caracterización parcial de plásmidos.
36	Fenotipo, genotipo y replicones en las cepas de <i>E. coli</i>
37	Características fenotípicas y genotipo y en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp., asilados de muestras alimentarias y clínicas
38	Características fenotípicas y genotípicas en las cepas de <i>E. coli</i> asilados de muestras alimentarias

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Sitios de colonización de los patovares de <i>E. coli</i>	
2	Estructura química de los antibióticos e inhibidores β -lactámicos	
3	Mecanismo de acción de los β -lactámicos	
4	Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos	
5	Estructura química de las fluoroquinolonas	
6	Estructura química de las tetraciclinas	
7	Subfamilias MOB por DPMT y su correspondencia con los tipos Rep	
8	Fenotipo BLEE en <i>Citrobacter</i> spp.	
9	Perfil electroforético de la PCR cuádruplex para la identificación de los filogrupos en <i>E. coli</i>	
10	Amplificación del gen <i>uidA</i> para la identificación de cepas de <i>E. coli</i>	
11	Prueba positiva del ácido fenilborónico para evaluar la producción fenotípica de BLEE en bacterias productoras de AmpC inducible	
12	Prueba de sinergismo por el método de difusión con doble disco para evaluar la producción fenotípica de BLEE en <i>E. coli</i> .	
13	Amplificación de los genes <i>eae</i> y <i>bfpA</i> (EPEC) y <i>aatA</i> y <i>aaiC</i> (EHEC) en la cepa BUAP94Ec	
14	Productos de PCR cuádruplex (<i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> , TsPE4.C2) para la clasificación filogenética de las cepas de <i>E. coli</i>	
15	Electroforesis de la amplificación con los oligonucleótidos específicos para el filogrupo C y oligonucleótidos esoecíficos para el filogrupo E	
16	Amplificación de CTX-M, TEM y SHV en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.	
17	Electroforesis de la amplificación del fragmento <i>ampR-bla_{CMY}-blc</i> en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.	
18	Arbol filogenético <i>neighbor-Joining</i> (NJ) basados en secuencias de 674pb del gen 16S ARNr de la cepa de <i>C. freundii</i> BUAP385Cf	
19	Relación filogenética del gen <i>bla_{CMY}</i> en la cepa BUAP385 con las variantes 26 y 37	
20	Árbol filogenético <i>neighbor-Joining</i> (NJ) basados en secuencias de 1146 pb del gen <i>bla_{CMY-144}</i> de la cepa BUAP385Cf y 95 variantes de éste gen reportadas en el GenBank.	
21	Entorno genético de CMY-13 en el plásmido p541-H (IncN) en <i>E. coli</i>	
22	Estrategia para la secuenciación del entorno genético de CMY-144 en la cepa BUAP 385.	
23	Electroforesis de la amplificación del entorno genético (<i>sugE-CMY</i> (1920pb) y <i>CMY-frdB</i> (2594pb) en la cepa BUAP385Cf	

24	Entorno genético de <i>bla</i> _{CMY-144} en la cepa de <i>C. freundii</i> BUAP385Cf obtenido por secuenciación.
25	Perfil plasmídico por PFGE-S1 de la cepa de <i>C. freundii</i> BUAP385Cf
26	Electroforesis de la amplificación de CTX-M en las cepas de <i>E. coli</i>
27	Electroforesis de la amplificación de TEM en las cepas de <i>E. coli</i>
28	Amplificación del gen <i>qnrB</i> en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.
29	Amplificación del gen <i>aac(3')-II</i> en las cepas de <i>E. coli</i> aislados de leche
30	Perfil plasmídico en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.
31	Amplificación de la subfamilia MOB P51 y MOB C12 en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp
32	Perfil plasmídico en las cepas de <i>E. coli</i>
33	Múltiplex 1 del método PBRT
34	Múltiplex 3 del método PBRT
35	Simplex 3 del método PBRT

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	TÍTULO	PÁGINA
1	Perfil de resistencia en la cepas de <i>Citrobacter</i> spp.	
2	Perfil de susceptibilidad en las cepas de alimentos, potadores y clínicas de <i>Citrobacter</i> spp.	
3	Perfil de susceptibilidad en la cepas de <i>E. coli</i>	
4	Comparación de los perfiles de susceptibilidad entre las cepas de <i>Citrobacter</i> spp., y <i>E. coli</i>	
5	Porcentaje de sinergismo a los antibióticos en la prueba de difusión con doble disco	
6	Frecuencia de grupos filogenéticos en las cepas de <i>E. coli</i>	
7	Porcentaje de amplificación mediante PCR de CTX-M, TEM, SHV, OXA y CMY	
8	Porcentaje de amplificación de CTX-M, TEM, SHV y OXA-1	
9	Porcentaje de amplificación de los genes involucrados en la resistencia quinolonas	
10	Porcentaje de amplificación de los genes <i>aac(3')-II</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet (B)</i> y <i>cmlA</i> en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp	
11	Porcentaje de amplificación de los gene <i>aac(3')-II</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet (B)</i> y <i>cmlA</i> en las cepas de <i>Citrobacter</i> spp.	

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme brindado la oportunidad de formarme profesionalmente, realizando mis estudios profesionales y de posgrado siendo para mí una segunda casa donde halle los conocimientos y experiencia necesaria para ser una persona con las capacidades intelectuales y profesionales que la sociedad mexicana e internacional demandan.
- Al Instituto de Ciencias y en especial al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme brindado la oportunidad de realizar el segundo sueño más importante de mi vida; la maestría. Fue para mí un placer pertenecer a una generación más en este bello instituto donde todo inicio como una estancia un febrero de 2013 y que ha concluido con la obtención del grado de maestría. Mi más sincero agradecimiento y admiración a éste instituto
- Al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por brindarme en la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación que hoy concluye con ésta tesis en la cual plasmo dos años de trabajo, esfuerzo y dedicación, logrando terminar ésta bella etapa de mi vida en la ciencia.
- A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo incondicional para realizar la presentación de este trabajo en el **“XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología”** celebrado en la provincia de Santa Fé, Rosario, Argentina el día 26-30 de septiembre de 2016, sin el cual no hubiera sido posible. De igual forma esto contribuye al fortaleciendo así la difusión del trabajo científico que se realiza en nuestra universidad.
- Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla por el apoyo para asistir al congreso antes mencionado.
- Al Hospital para el Niño Poblano por donar cepas que se incluyeron en esta tesis, a quien agradezco la confianza y la disponibilidad para realizar dicha donación.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A la Doctora Rosy por depositar en mí la confianza de realizar un proyecto de maestría y de dirigir este proyecto. Agradezco enormemente todos los consejos que me dio para sacar adelante este trabajo. Sin duda alguna es un ejemplo de persona digna de merecer todo mi respeto, es un ejemplo a seguir y no me queda más que decir que GRACIAS, MUCHAS GRACIAS POR TODO Dra. Rosy.
- A la Doctora Paty por ser un apoyo incondicional en el laboratorio así como un ejemplo de persona, al tiempo dedicado a la revisión de esta tesis además de estar siempre disponible para la aclaración de cualquier duda. Me llevo lo mejor de usted; su afán por exprimir cerebros para que aprendamos a usarlos. Su clase de interacción H-P fue sin duda de las mejores experiencias profesionales que llevaré conmigo por mucho tiempo. Por todo, muchísimas gracias.
- A la Dra. Maguie por ser parte de este proyecto que inició como algo pequeño y que fue creciendo como una bola de nieve, tanto que hasta usted tubo que ayudarme a hacer unas cosas del laboratorio, le agradezco por poner a nuestra disposición su laboratorio y el material necesario para realizar algún experimento. Le agradezco su apoyo incondicional y todo lo que me enseñó en su materia. Muchas gracias.
- Al Dr. Ulises por los consejos para sacar los mejores resultados y las innumerables cosas que directa o indirectamente me dejaba revisar para mi tesis, por su tiempo y dedicación para asistir a los tutorales y a estar al pendiente con la realización de este proyecto de tesis. Muchas gracias.
- Al Dr. Ygnacio Martínez Laguna, el Dr. Nacho. En primer lugar, por su magnífica clase de patogenicidad, la cual considero una excelente clase, gracias por compartir sus conocimientos a pesar de sus múltiples compromisos. En segundo lugar, porque gracias a la dependencia que tiene a su cargo, la VIEP, fue posible realizar el viaje a Argentina a presentar este trabajo en un congreso de alto impacto, que sin su apoyo, esto hubiera sido posible. Muchas gracias.
- A todos los profesores que nos dieron alguna clase en la maestría, al Dr. Luis Javier, a la Dra. Lilia, a la Dra. Baca, al Dr. Miguel, Al Dr. Luis Ernesto y la Dra. Vianey, al Dr. Alfredo, etc. Gracias por compartir sus conocimientos y dedicar un poco de su valioso tiempo a enseñarnos.

- A Elena por ser una extraordinaria persona, por ser un apoyo en todo y compartir conmigo algunas de sus dudas y experiencias. Eres una excelente persona y muy inteligente y es por ello que me siento complacido por haber compartido contigo el laboratorio. Te agradezco toda la ayuda que me brindaste a lo largo de este proyecto y te deseo lo mejor en el doctorado. Gracias Elenita.

- A Gerardo. Gracias por el tiempo dedicado a revisar mis presentaciones para tutorial y el tiempo que dedícate a resolver mis dudas y por todo el apoyo incondicional que me brindaste. Muchas gracias

.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A mis padres

ISABEL Y FILOGONIO

Por su apoyo y amor incondicional. Esta tesis es, el resultado de un largo camino que sin ustedes no hubiera sido posible.

- A mis hermanos

CITLALI, ADRIÁN Y GUSTAVO

Por su apoyo, cariño, travesuras, golpes, regaños, peleas y toda una vida llena de satisfacciones y experiencias inolvidables. Ustedes son el motor que me impulsa a ser una persona mejor preparada y saber que no hay cosas imposibles sino complicadas que son retos pequeños para nosotros. Jamás olvidemos de dónde venimos y a dónde queremos llegar. Los amo

- A mis amiguitos

A Oli... la Ollis. Tal vez no fuimos mejores amigos pero somos los mejores compañeros de ideales y de la maestría. Sabes que te aprecio mucho aunque no nos aguantemos mas de una semana jajaja (Argentina, boliche.. tu sabes). Aunque no lo creas admiro mucho tu empeño y tu centralidad. Recuerda que algún día no muy lejano tenemos que colaborar en nuestras líneas de investigación y hacer de la ciencia algo cada día mejor. Te quiero Oli.

A Jessy y Era, que más que compañeras, fuimos como hermanos de laboratorio y de maestría. Las estimo mucho y sé que van a llegar muy lejos porque además de ser muy inteligentes son unas excelentes personas. Gracias por compartir su formación académica conmigo y espero de todo corazón nunca perder contacto con ustedes. Las quiero chicas.

A Xadeni que aunque ya casi no hablamos ni nos vemos, sabemos que siempre tendremos a alguien en nosotros que pueda hablar de sus problemas existenciales. Te estimo mucho y sé que vas a hacer una gran investigadora porque eres muy inteligente.

- A mis compañeros del laboratorio

A Caro, Alex, Andrea, Aime, Tati, Emilio, Marisol, Cris, a la M. C. Alama, al M. C. Edwin, lalo, Omar y algunos otros que has llegado y se han ido del lab, por ser unos excelentes compañeros y compartir sus conocimientos y disposición para sacar adelante el trabajo, por ser unas excelentes personas y ayudar siempre a los que no tenemos tanta experiencia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido Clavulánico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMP	Ampicilina
AmpC	β -lactamasa derivada de la contracción "β-lactamasa que otorga resistencia a Ampicilina con Codificación Cromosomal"
AMC	Amoxicilina con Ácido Clavulánico
AN	Amikacina
ATM	Aztreonam
Bet	Bromuro de Etidio
BHI	Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón
BLAST	Herramienta básica de búsqueda para alineamientos locales
BLEE	β -Lactamasa de Espectro Extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CTX	Cefotaxima
CTX-M	β -lactamasa derivada de la contracción "Cefotaximasa aislada en Munich"
EMB	Medio de cultivo Eosina Azul de Metileno
FEP	Cefepime
Flich	Tv Programa para la visualización de secuencias nucleotídicas
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
IPM	Imipenem
LIA	Agar Hierro Lisina
MEM	Meropenem
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
M-H	Medio de cultivo Müller Hinton
MIO	Medio de Movilidad Indol Ornitina
NA	Ácido Nalidíxico
NN	Tobramicina
OXA	β -lactamasa derivada de la contracción de: "β-lactamasa que otorga resistencia a Oxacilina"
PBP	Proteína unidora de penicilina (protein binding penicilin)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SHV	β -lactamasa derivada de la contracción "Sulfhidril Variable"
SXT	Trimetoprim con Sulfametoxazol
Te	Tetraciclina

TEM	β -lactamasa derivada de la contracción del nombre griego "Temoniera"
TLA-1	β -lactamasa derivada de la contracción del nombre de la cultura "Tlahuica"
Traslate tool	Programa para realizar el cambio de nucleótidos a aminoácidos
Tris-HCl	Tris - Ácido Clorhídrico
TSA	Medio de cultivo Soya Trypticaseína
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. Características generales de las enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas), se encuentra dentro de las “Gamma-proteobacterias” (Kersters *et al.*, 2006), y pertenece al orden XIII de Enterobacterales. Según la segunda edición 2001 del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, la familia está conformada por 41 géneros y más de 100 especies, formada por bacilos Gram negativos de 0.3-3 μm , no esporulados, anaerobios facultativos y quimiorganotróficos.

Todas las especies de las enterobacterias fermentan la glucosa, son oxidasa negativa y reducen los nitritos a nitratos. Pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles. Se encuentran en diferentes ambientes como suelo, agua, frutas, vegetales, granos, gusanos y humanos donde pueden ser patógenos potenciales. Algunas especies causan enfermedades diarreicas incluyendo fiebre tifoidea y disentería bacilar (*Shigella dysenteriae*). Muchas especies no asociadas con enfermedades diarreicas son referidas como patógenos oportunistas (como *Citrobacter* spp., *Serratia marcescens*, etc.) (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

1.1. *Citrobacter* spp

El género *Citrobacter* descrito en el año 1932 por Werkman y Gillen, es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*; es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, con forma de cocobacilo, con un diámetro de 0.3-1 μm y una longitud de 0.6-6 μm . Es móvil, con flagelos periféricos, fermenta el manitol con producción de gas y H_2S , puede también usar el citrato como fuente de carbono. El género puede dividirse en 43 serogrupos basados en el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y en 20 quimiogrupos basados en la composición de los carbohidratos del LPS (Holmes y Aucken, 1998, Knirel *et al.*, 2002).

Citrobacter spp., se halla frecuentemente en el agua, suelo, alimentos y tracto intestinal de los animales incluyendo el hombre. Ha sido reconocido como agente etiológico de distintos procesos infecciosos tales como infección urinaria, infección quirúrgica, infección de piel y tejido celular subcutáneo, bacteriemia y sepsis, meningitis y abscesos cerebrales. En el año 1993, Brenner y colaboradores, describieron por hibridación de ADN once genomoespecies y propusieron utilizar una serie de pruebas bioquímicas y de crecimiento

en diferentes sustratos como única fuente de carbono para identificar las diferentes genomoespecies (Brenner *et al.*, 1993).

En la actualidad el género *Citrobacter* está compuesto por las siguientes genomoespecies: complejo *Citrobacter freundii* (*C. freundii*, *C. braakii*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii*, *C. youngae*, *C. gillanii*, *C. murlinae* y *C. rodentium*), *C. koseri*, *C. amalonaticus* y *C. farmeri* (Ageron *et al.*, 1993)

En el género *Citrobacter* la resistencia natural a β -lactámicos está dada por la presencia de cefalosporinasas inducibles de clase C (AmpC), por lo tanto, aunque las pruebas de sensibilidad a ampicilina y cefalotina den resultados de sensibilidad por punto de corte, deben ser informadas como resistentes a estos antibióticos. Respecto de las cefalosporinas de tercera generación, si no se trata de una mutante desreprimida, se informa la sensibilidad como tal, pero considerando que, si se emplea en el tratamiento, puede fallar por selección de mutantes (Underwood, 2004; Petrella *et al.*, 2006).

1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y es una enterobacteria presente en la microbiota intestinal humana, representando aproximadamente el 1% de los microorganismos comensales intestinales (Todar, 2002). Ciertas cepas de *E. coli* han sido implicadas en diferentes enfermedades tanto en humanos como en animales. Estos patovares se pueden clasificar en dos grupos; el primero de ellos corresponde a cepas de *E. coli* diarreagénicos [*E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difuso adherente (DAEC)] y el segundo grupo *E. coli* extraintestinales [*E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* meningitis neonatal (NMEC)] (figura 1) (Croxen y Finlay, 2010).

1.2 Patovares

1.2.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC, es la mayor causa de diarrea en infantes pudiendo ésta ser letal en los países en vías de desarrollo (Kaper *et al.*, 2004) y tiene la capacidad de adherirse a las células formando microcolonias (adherencia localizada). Una vez formadas las microcolonias, inicia una segunda fase de adherencia culminando con la destrucción de las microvellosidades intestinales, a este proceso se le denomina esfacelamiento enterocítico.

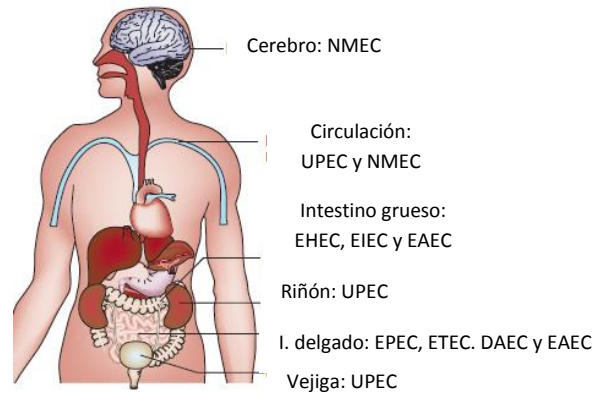


Figura 1. **Sitios de colonización de los patovares de *E. coli*.** Modificado de Croxen y Finlay, 2010.

EPEC tiene como factores de virulencia el pili tipo IV denominado pilus formador de mechones o BFP (por sus siglas en inglés Bundle forming pili) que está codificado en el plásmido factor adherente EPEC (EAF). BFP interactúa con otras bacterias EPEC, para formar microcolonias por adherencia localizada y con los receptores N-acetil-lactosamina presente en la superficie celular (Croxen y Finlay, 2010). El efector Tir (receptor de intimina traslocada) sirve de receptor para la proteína intimina. Tras la unión de la intimina con su receptor Tir, hay una adherencia íntima entre EPEC y el enterocito.

1.2.2 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

El pollo es un reservorio común de este microorganismo (Croxen y Finlay, 2010). EHEC coloniza el íleon distal y el intestino grueso de los humanos, es el agente causal de la gastroenteritis severa en países desarrollados. La transmisión a humanos generalmente es debido a alimentos y agua contaminados y produce diarrea sanguinolenta pudiendo complicarse a un Síndrome Urémico Hemolítico, potencialmente letal.

Todas las EHEC serotipo O157 portan un plásmido de 92 Kb llamado pO157 que codifica numerosos factores de virulencia. Sin embargo, el mayor factor de virulencia de EHEC está en el profago que codifica para la toxina Shiga (Stx: conocido también como Verocitotoxina). El receptor de Stx es el globotriaocilceramida (Gb3s) que en los pollos se encuentra en el tracto gastrointestinal, lo cual explica por qué en pollos es asintomático mientras que en los humanos el receptor está presente en las células Paneth en la mucosa intestinal humana y en el epitelio de los riñones humanos (Nataro y Kaper, 1998).

1.2.3 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

ETEC es la mayor causa de la diarrea del viajero y puede tener consecuencias fatales en niños menores de 5 años de edad. ETEC coloniza las células epiteliales del intestino delgado en humanos y es mediado por los factores de colonización (CFs, por sus siglas en inglés) el cual puede ser una fimbria helicoidal o fibrilar. Se han identificado una amplia variedad de CFs, sin embargo CFA/I, CFA/II y CFA/IV son los más comunes.

La diarrea causada por ETEC esta mediada por la secreción de la enterotoxina termoestable (STs) y/o la enterotoxina termolábil (LT). STs incrementan los niveles intracelulares de GMP cíclico resultando en la absorción incompleta de Na⁺ y la apertura de acuaporinas en el lumen intestinal (Turner *et al.*, 2006).

1.2.4 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

EIEC tiene el mismo mecanismo de patogenicidad que *Shigella* además son parecidos bioquímica y antigénicamente. EIEC se internalizan y se reproduce dentro de las células epiteliales, las cuales son destruidas.

El efector IpaC, es un factor de virulencia clave en la invasión, el cual activa la quinasas SRC para reclutar el complejo ARP2/3 causando la polimerización de la actina. Otros efectores, tales como IpgD, IpaA y VirA, están implicados en la desestabilización de actina y microtúbulos para promover la invasión en un fagosoma, y escapar de éste. En *Shigella*, IpaB media la detención del ciclo celular (inhibidor de anafase) y OspE ha demostrado interactuar con la quinasa unida a integrina para prevenir el desprendimiento de células epiteliales. La apoptosis también se evita a través de IpgD (Schroeder y Hilbi, 2008).

1.2.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC es la segunda causa de diarrea del viajero en países en vías de desarrollo y en países desarrollados. Además, es reconocido como la principal causa de diarrea endémica y epidémica alrededor del mundo. EAEC coloniza el intestino grueso y puede causar inflamación del colon y la diarrea que causa es acompañada con sangre y moco.

Sus factores de virulencia son fimbrias de Adherencia Agregativa (AAF: aggregative adherence fimbriae, por sus siglas en inglés) codificados en los plásmidos PAA y la enterotoxina Shigella 1 (ShET1: Shigella enterotoxin 1, por sus siglas en inglés), de la cual el mecanismo no está claro aún (Arenas-hernández *et al.*, 2012)

1.2.6 *E. coli* difuso adherente (DAEC)

DAEC es un grupo heterogéneo que genera adherencia difusa en células HeLa y HEP-2, el fenotipo está mediado por proteínas codificadas por una familia de operones relacionados, los cuales incluyen fimbrias y adhesinas afimbriales. DAEC coloniza el intestino delgado y ha sido implicado en diarrea en niños entre los 18 meses y 5 años de vida así como en infecciones del tracto urinario recurrentes en adultos (Croxen y Finlay, 2010).

1.3 Filogenia de *E. coli*

El análisis filogenético de *E. coli* en los años ochenta, mostró que se pueden agrupar en cuatro posibles filogrupos (A, B1, B2 y D) y que las cepas virulentas causantes de infecciones extraintestinales mayoritariamente pertenecen al filogrupo B2 y en menor proporción al filogrupo D, por otro lado, la mayoría de las cepas comensales pertenecen al filogrupo A y en menor cantidad al filogrupo B1 (Clermont *et al.*, 2000). En 2013, Clermont y colaboradores proponen un nuevo método de análisis mediante PCR para identificar los cuatro filogrupos (A, B1, B2 y D) y cuatro nuevos filogrupos (C, E y F y *Escherichia* clado I).

Los marcadores genéticos usados para la identificación son *chuA* (un gen requerido para el transporte del grupo hemo en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7), *yjaA* (un gen identificado en el genoma de *E. coli* con actividad desconocida), TspE4.C2 (gen que codifica para una lipasa esterasa) y *arpA* (gen que codifica para una proteína reguladora de la acetil CoA sintasa y es considerado un factor de virulencia ligado a la meningitis neonatal) son usados para designar 8 filogrupos, siete perteneciente a *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E y F) y uno correspondiente a *Escherichia* clado I (Clermont *et al.*, 2013). Esta clasificación filogenética de *E. coli* provee información acerca de las características fenotípicas y genotípicas, su nicho ecológico y su habilidad para causar daño.

2. Antibióticos

2.1 Antibióticos β -lactámicos

El primer tratamiento parenteral con penicilina se realizó por primera vez en 1940. Aún ahora después de más de 70 años tras el descubrimiento de la penicilina, los β -lactámicos, constituyen los antibióticos más prescritos en la práctica clínica (Suarez y Gudiol, 2009).

2.1.1 Estructura química y clasificación

Los antibióticos β -lactámicos son estructuras químicas que se caracterizan por la presencia de un anillo β -lactámico y un anillo secundario que juntos forman el núcleo β -lactámico (Figura 2) y una variedad de grupos funcionales que los hacen más específicos y aumentan su espectro de acción. El anillo define el mecanismo de acción y su baja toxicidad por unirse a las proteínas unidoras a penicilina (PBP por sus siglas en inglés) las cuales no están presentes en las células eucariontes.

La asociación del núcleo β -lactámico y cadenas lineales modifica las propiedades del compuesto resultante y origina la variedad de compuestos dando lugar a los diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactámicos e inhibidores de β -lactamasas (Figura 2).

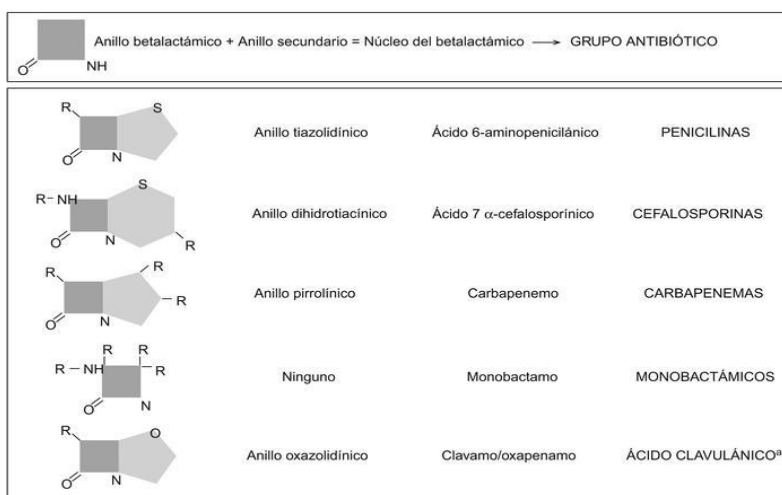


Figura 2. Estructura química de los antibióticos e inhibidores β -lactámicos.

2.1.2 Mecanismo de acción

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: el primero es la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y el segundo la inducción de la autólisis bacteriana. El anillo β -lactámico presenta una similitud estructural con la región del UDP-NAM-pentapéptido un componente de la síntesis de la pared bacteriana al que se unen estas enzimas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular

(Figura 3). Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica (Suárez y Gudiol, 2009).

Los antibióticos β -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las cepas que carecen de autolisina (generalmente son cepas tolerantes a los β -lactámicos) inhiben su crecimiento en presencia del β -lactámico, pero no se destruyen completamente (Suárez y Gudiol, 2009).

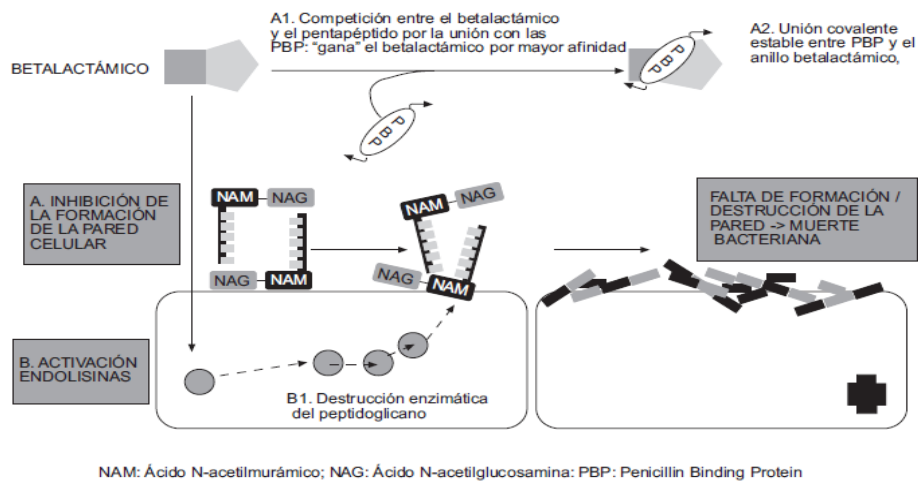


Figura 3. Mecanismo de acción de los β -lactámicos.

2.1.3. Resistencia a β -lactámicos

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente en los últimos años, caracterizado por una resistencia total o parcial de los microorganismos al efecto del antibiótico generado. Los microorganismos han desarrollado múltiples formas de evadir el agente antimicrobiano mediante mecanismos que involucran bombas, mutaciones y en especial enzimas como las β -lactamasas. Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos (Figura 4) en bacterias Gram negativas son 4: 1. Enzimas modificadoras del antibiótico, 2. Bombas de expulsión, 3. Cierre de porinas y 4. Proteínas unidoras de penicilinas (Tafur, 2008).

2.1.4. β -lactamasas

Son enzimas capaces de romper el anillo β -lactámico presente en los antibióticos β -lactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antimicrobiana. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, hecho que representa un gran reto para el control de las infecciones. Las β -lactamasas hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación y por mutaciones puntuales puede aumentar su espectro y convertirse en β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

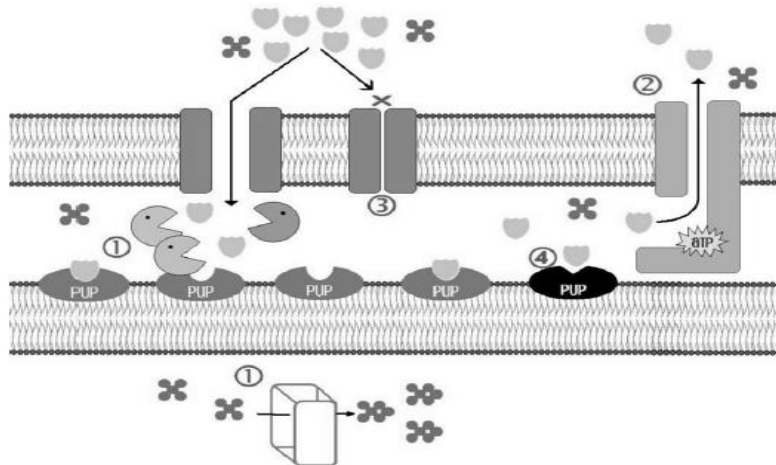


Figura 4. **Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos.** 1. Enzimas modificadoras de antibiótico, 2. Bombas de expulsión, 3. Cierre de porinas y 4. Proteínas de unión a penicilina (PUP), (Tafur, 2008).

2.1.4.1 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las β -lactamasas de espectro extendido, son enzimas producidas por bacilos Gram negativos, fundamentalmente enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y otros. Son capaces de inactivar, además de las penicilinas y las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam (Álvarez, 2010).

Se reconocen dos clasificaciones según sus características funcionales y genotípicas, mediante la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros y su correlación con la clasificación molecular de Ambler:

a) La clasificación molecular de Ambler (Ambler *et al.*, 1980) divide a las β -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D) basándose en la estructura de la proteína. Las enzimas de los

grupos A, C y D son serin- β -lactamasas, que contienen un aminoácido serina en su centro activo, y las del grupo B son metalo- β -lactamasas, dependientes de Zn^{+2} .

b) La clasificación funcional propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 (Bush *et al.*, 1995) establece diferentes grupos según su sustrato y el perfil de inhibición por inhibidores de β -lactamasas.

- El grupo 1 incluye enzimas de la clase C de Ambler que hidrolizan cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam.
- El grupo 2 incluye enzimas de las clases A y D de Ambler que se inhiben por el ácido clavulánico y está compuesto por 12 subgrupos.
- El grupo 3 incluye enzimas de la clase B de Ambler. Son metalo- β -lactamasas que requieren para actuar de la unión de Zn^{+2} a su centro activo y que se inhiben por agentes quelantes como el EDTA, pero que no se inhiben por el ácido clavulánico o por tazobactam.
- La mayoría de enzimas incluidas en el grupo 4 no están completamente caracterizadas y podrían ser clasificadas en los grupos anteriores.

Aunque existen diferencias en la prevalencia de las distintas familias, las mayoritarias son las de tipo TEM, SHV y CTX-M, seguidas de OXA, PER y VEB. Otras BLEE identificadas menos frecuentemente son SFO, TLA, GES, IBC y BEL (Cantón, 2008).

2.1.4.2 BLEE TEM

La enzima TEM-1 se describió por primera vez en 1965 en Grecia en un aislado de *E. coli* procedente de una paciente llamada Temoniera, de ahí la denominación de TEM, a la fecha se han descrito 223 variantes de esta enzima (www.lahey.org/studies, 2016). Cerca del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* es debido a la producción de TEM-1 (Livermore, 1995). Esta enzima es también responsable de la resistencia a ampicilina y penicilina que ha sido vista en *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*.

TEM-3, originalmente reportada en 1989, fue la primera β -lactamasa tipo TEM con un fenotipo de BLEE (Sougakoff, 1988).

La mayoría de estas enzimas se ha descrito en *E. coli* y *K. pneumoniae*, aunque también se han identificado en enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* y *Salmonella* spp. así como en *P. aeruginosa* (Bradford *et al.*, 2001).

2.1.4.3 BLEE SHV

La enzima SHV-1 es una β -lactamasa de espectro reducido que tiene actividad contra penicilinas y fue la primera β -lactamasa codificada cromosómicamente que se describió en el género *Klebsiella*. A la fecha se han descrito 193 variantes de esta familia (<http://www.lahey.org>, 2016)

Las enzimas de tipo SHV (Sulfhidrilo Hidroxil Variable) derivan de la β -lactamasa cromosómica de *K. pneumoniae* SHV-1. La primera BLEE de este tipo, que también fue la primera BLEE descrita, se detectó en 1983 en Alemania en un aislado de *K. ozaenae* que presentaba un fenotipo de resistencia poco habitual y que se transfería por conjugación. Se trataba de la variante SHV-2 que difería de su predecesor SHV-1 en una mutación aminoacídica (Knothe *et al.*, 1983). Gly238Ser que altera el espectro de actividad en SHV-2, representa por sí sola las propiedades de amplio espectro de esta β -lactamasa (Hertage *et al.*, 1999).

2.1.4.4 BLEE OXA

Las β -lactamasas tipo OXA (llamadas así porque tienen la capacidad de hidrolizar oxacilina), difieren de las enzimas tipo TEM y SHV porque pertenecen a la clase molecular D de Ambler y al grupo funcional 2d. Estas enzimas confieren resistencia a ampicilina y cefalotina y son caracterizadas por su alta actividad hidrolítica contra oxacilina y cloxacilina e inhibidas pobremente por el ácido clavulánico (Bush *et al.*, 1989).

OXA-10 hidroliza (débilmente) cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. Las BLEEs OXA de tipo A fueron descubiertas originalmente en *P. aeruginosa*. Otras BLEE OXA son: OXA -11, 14, 16, 17, 19, 15, 18, 28, 31, 32, 35, y 45. Éstas confieren resistencia a cefotaxima y a veces a ceftazidima y aztreonam (Toleman *et al.*, 2003).

Diversas BLEE tipo OXA han sido derivadas de OXA-10, hasta este momento se han descrito 19 variantes de esta familia con fenotipo BLEE (<http://www.lahey.org>, 2016).

2.1.4.5 BLEE CTX-M

La familia de β -lactamasas mediada por plásmidos llamada cefotaximasa (CTX-M), hidroliza preferentemente cefotaxima. Han sido encontradas principalmente en las cepas de *Salmonella* y *E. coli*, pero también han sido descritas en otras especies de enterobacterias (Paterson y Bonomo, 2005). Las enzimas tipo CTX-M constituyen un linaje

diferente de β -lactamasas de clase molecular A y es un grupo que está creciendo rápidamente. Estas enzimas no están muy estrechamente relacionadas con TEM y SHV ya que sólo comparten el 40% de identidad con estas (Jacoby y Medeiros, 1991). Las enzimas tipo CTX-M se dividen según su secuencia de aminoácidos en cinco grupos (Cantón *et al.*, 2006; Rossolini *et al.*, 2008): Grupo 1: CTX-M-1 (CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -23, -28) , Grupo 2: CTX-M-2 (CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, Toho-1), Grupo 3: CTX-M-8, Grupo 4: CTX-M-9 (CTX-M-9, 13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, Toho-2), Grupo 5: CTX-M-25

La primera identificación de ésta enzima fue a principios de 1989. La primera publicación que reconoce una BLEE del grupo CTX-M fue el reporte de una *E. coli* resistente a cefotaxima pero susceptible a ceftazidima, recuperada del oído de un niño de cuatro meses de edad en Munich (Bauernfeind *et al.*, 1990). La enzima responsable de este fenotipo BLEE en particular que no hidroliza ceftazidima fue nombrada como CTX-M-1 en referencia a su actividad hidrolítica contra cefotaxima (CTX como sus siglas y M de Munich). Hasta este momento 172 BLEE tipo CTX-M se han reportado (<http://www.lahey.org/studies>, 2016).

2.1.4.6 BLEE AmpC

En la clasificación estructural de Ambler las enzimas β -lactamasas AmpC, pertenecen a la clase C (hidrolizan cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam), mientras que en el esquema de clasificación funcional de Bush éstos se asignan al grupo 3. En bacterias como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* y *P. aeruginosa* pueden, por mutaciones, sobreexpresar su β -lactamasa AmpC cromosómica la cual provee resistencia a oximino- y 7- α -metoxicefalosporinas y monobactams. Estas enzimas pueden ser codificadas en el cromosoma o en plásmidos. Las β -lactamasas AmpC son clínicamente importantes, ya que son activas frente a penicilinas, pero incluso más activas frente a cefalosporinas y pueden hidrolizar cefamicinas como ceftaxina; oxi-amino-cefalosporinas como ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona además de monobactams como aztreonam y no se ven afectados por los inhibidores de β -lactamasas disponibles (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam) (Philippon *et al.*, 2002). Las β -lactamasas AmpC mediadas por plásmidos difieren de AmpC cromosómicas en ser inducibles y son típicamente asociados con resistencia a múltiples fármacos (Barnaud *et al.*, 1998).

2.1.4.6.1 β -lactamasas plasmídicas tipo AmpC

En 1989, Bauernfeind y colaboradores describieron por primera vez en un aislado de *K. pneumoniae* la capacidad de transferir resistencia a cefoxitina, cefotetan, así como penicilas, oximino-cefalosporinas y monobactams a *E. coli*. La enzima llamada CMY-1 por su actividad cefamicinasa, tiene un punto isoeléctrico de 8.0 y fue más sensible a la inhibición por sulbactam que por ácido clavulánico o tazobactam, sugiriendo que se trataba de una enzima de clase C.

Subsecuentemente, se han identificado β -lactamasas tipo AmpC plasmídicas alrededor del mundo y han sido nombradas acorde al fenotipo de resistencia producido: a cefamicinas (CMY), cefoxitina (FOX), y moxalactam (MOX) o latamoxef (LAT), a el tipo de β -lactamasa: tal como tipo AmpC (ACT) o clase C de Ambler (ACC), y al sitio de descubrimiento, tal como Mariam Hospital in Providence, R. 1. (MIR-1) o Dhahran Hospital in Saudi Arabia (DHA) (Philippon *et al.*, 2002).

CMY-2 es la β -lactamasa más ampliamente identificada alrededor del mundo, los primeros reportes fueron en *E. cloacae* y *Salmonella*. Posteriormente fueron identificadas más variantes de esta enzima y en la actualidad se han reportado 137 variantes (<http://www.lahey.org/Studies>, 2016).

Una variedad de elementos genéticos han sido implicados en la movilización de genes *ampC*. La secuencia de inserción ISEcp1 está asociada con algunos alelos de CMY incluyendo CMY-2, CMY-4, CMY-5, CMY-7, CMY-12, CMY-14, CMY-15, CMY-16, CMY-21, CMY-31 y CMY-36, así como la β -lactamasa ACC-1 y ACC-4. Otros genes *ampC* han sido encontrados adyacentes a regiones comunes de secuencias de inserción (ISCR1: insertion sequence common región, por sus siglas en inglés) los cuales son genes movilizados (típicamente) por integrones complejos de clase 1.

Por otro lado, el gen de CMY-13 y su gen regulador *ampR* está unido con la secuencia de inserción IS26 rio arriba del gen de la trasposasa (*tnpA*) flanqueado con segmentos repetidos invertidos (Jacoby, 2009).

2.1.4.7 β -lactamasas con actividad carbapenemasa

Las β -lactamasas de clase A, C y D son serin enzimas mientras que las de clase B son metalo- β -lactamasas (MBL) ya que requieren el ión zinc para su actividad. Sin embargo, se han encontrado serin- β -lactamasas con actividad carbapenemasa, es decir, que tienen la capacidad de hidrolizar carbapenémicos como imipenem, además de cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima y aztreonam (Bontron *et al.*, 2015).

Se conocen diversos grupos de MBL: IMP, VIM, SPM, GIM-1, SIM-1, AIM-1 y NDM-1. Las enzimas de tipo IMP y VIM constituyen las más ampliamente diseminadas en el mundo y se han descrito principalmente en *P. aeruginosa* y otros microorganismos no fermentadores, y con menor frecuencia en enterobacterias. Generalmente se encuentran codificados en integrones de clase 1 o clase 3, que pueden, a su vez, estar localizados en plásmidos y transposones, lo cual contribuye a la amplia diseminación de estos genes de resistencia (Cejas *et al.*, 2008).

3. Quinolonas

Las quinolonas y fluoroquinolonas son ampliamente usadas en el tratamiento de numerosas infecciones humanas y veterinarias alrededor del mundo (Shao, *et al.*, 2011). Fue en la década de los 80's y principios de 1990 cuando se introdujeron en la clínica nuevas fluoroquinolonas con actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Rodríguez-Martínez, 2005).

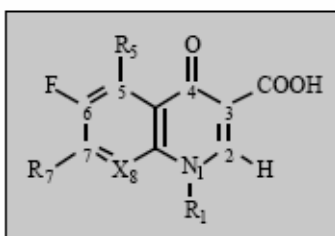


Figura 5. Estructura química de las fluoroquinolonas.

En nuestros días las quinolonas son usadas en numerosos procesos infecciosos, así como agentes profilácticos en pacientes con neutropenia. Por otro lado, el uso de las quinolonas y otros antibióticos se ha ampliado al ámbito veterinario donde generan una presión de selección en la microbiota del animal.

3.1 Clasificación de las quinolonas

Las quinolonas pueden clasificarse en generaciones dependiendo de su actividad y antigüedad de descubrimiento. Las de primera generación (ácido nalidíxico, ácido pipemídico), poco usadas actualmente, tienen actividad frente a enterobacterias y algún otro bacilo Gram negativo y son prácticamente inactivas frente a Gram positivos y anaerobios. A partir de aquí, se les incorpora un átomo de flúor en la posición 6 y se les

llaman fluoroquinolonas. Las de segunda generación (norfloxacin) presentan una actividad mucho mayor frente a Gram negativos, incluida *P. aeruginosa*, y tienen moderada actividad frente a Gram positivos y prácticamente nula frente a anaerobios. Las de tercera generación (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino) mantienen las características de las de la segunda, pero además tienen una mejor actividad frente a Gram positivos. Las de cuarta generación (moxifloxacino) aportan una mejora en la actividad frente a Gram positivos y además una buena actividad frente a anaerobios (Alós, 2003).

3.2 Mecanismos de acción de las quinolonas

Las quinolonas actúan atrapando a la enzima ADN-girasa sobre el ADN durante la reacción de topoisomerización, la unión del antimicrobiano forma y estabiliza el complejo produciéndose una barrera física para el movimiento de la horquilla de replicación. El complejo con la ADN-girasa-quinolona produce la aparición de extremos libres de ADN sobre los cuales actuarán exonucleasas para romper las cadenas de ADN, así como la activación del sistema SOS, teniendo como consecuencia la muerte celular. En los Gram positivos la diana primaria es, en muchos casos, la topoisomerasa IV, mientras que en los Gram negativos es la ADN-girasa. (Rodríguez-Martínez, 2005).

3.3 Resistencia a quinolonas

3.3.1 Mecanismos de resistencia cromosómicos a quinolonas

En *E. coli* y otras bacterias como *Citrobacter*, se ha observado que existe la resistencia cromosómica a quinolonas la cual está dada por mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* que codifican para la subunidad A de la DNA-girasa y topoisomerasa IV y en menor medida en los genes *gyrB* y *parE* que codifican para la subunidad B de ambas topoisomerasas. Estudios cristalográficos muestran que los cambios aminoacídicos tienen lugar en las regiones donde la enzima se une al ADN e interacciona con las quinolonas, los niveles de resistencia dependen de si los cambios tienen lugar en uno o ambos blancos.

La pérdida de la permeabilidad de la membrana, constituye otro mecanismo importante de resistencia a las quinolonas y otros antibióticos. Esto se debe a mutaciones en genes estructurales o reguladores que provocan la disminución del número efectivo de porinas (en *E. coli* *ompC* y *ompF*, por ejemplo) (Rodríguez-Martínez, 2005).

3.3.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos

3.3.2.1 Proteínas Qnr

En 1998 fue reportado por primera vez la existencia de una cepa clínica de *K. pneumoniae* aislada de un cultivo de orina en Birmingham, Alabama (EE. UU.) que portaba un plásmido de amplio rango de hospedero, y cuyas transconjugantes en *E. coli* incrementaban la resistencia a ácido nalidíxico de 4 a 32 µg/mL y a ciprofloxacino de 0.008 a 0.25 mg/mL.

Tras la clonación, secuenciación y expresión en un vector, el gen *qnr* se pudo purificar y estudiar la interacción con las quinolonas y sus blancos mediante estudios de movilidad electroforética. Éstos estudios permitieron identificar que al menos *in vitro*, que la proteína Qnr protege a la DNA-girasa en *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacino. La topoisomerasa IV también es protegida por las proteínas Qnr (Martínez-Martínez *et al.*, 2008).

Qnr pertenece a la familia de pentapéptidos de los cuales se conocen 90 miembros, los cuales están involucrados en la protección del DNA en algunas bacterias como las cianobacterias. Esta familia de proteínas está definida por la presencia de repeticiones en tándem de motivos A(D/N) LXX, donde X es cualquier aminoácido (Rodríguez-Martínez J. M, 2005).

QnrA Fue la primera proteína Qnr descrita. La búsqueda subsecuente de plásmidos involucrados en la resistencia a quinolonas, se identificaron cuatro proteínas más similares, QnrS, QnrB, QnrC y QnrD (Strahilevitz *et al.*, 2009).

3.3.2.2 Enzima Aac (6')-Ib-cr

Tras el estudio y caracterización de las proteínas Qnr, Strahilevitz y colaboradores descubrieron que la desigualdad observada de la CMI a ciprofloxacino en cepas portadoras del gen *qnrA* era debido a la presencia del gen que codificaba una aminoglucósido acetiltransferasa, *aac(6')-Ib*, que está asociada a la resistencia a los aminoglucósidos tobramicina, amikacina y kanamicina (Robicsek *et al.*, 2006). La secuenciación mostró dos cambios de codón, Trp102Arg y Asp179Tyr, que fueron suficientes para conferir resistencia a ciprofloxacino y éste alelo fue nombrado *aac(6')-Ib-cr* (por conferir resistencia a ciprofloxacino).

En 2012, Ruiz y colegas reportan por primera vez mediante experimentos de hibridación, la localización cromosómica en tres cepas de *E. coli*, una de *K. pneumoniae* y una de *K. oxytoca* (Ruiz *et al.*, 2012)

3.3.2.3 Bomba de eflujo OqxAB

La bomba de eflujo OqxA esta codificada por los genes *oqxA* y *oqxB* en el mismo operón. El gen *oqxA* codifica para una proteína de 391 aminoácidos denominada OqxA y el gen *oqxB* codifica para una proteína de 1050 aminoácidos designada como OqxB. Los genes *oqxAB* están codificados en el cromosoma de *K. pneumoniae* con diferentes niveles de expresión correlacionados con los diferentes niveles de susceptibilidad a olaquindox (Strahilevitz *et al.*, 2009).

3.3.2.4 QepA

La bomba de eflujo QepA esta codificada en el plásmido pHPA, descubierta en una cepa de *E. coli* aislada de un cultivo de orina en 2002. El gen *qepA* codifica una proteína putativa de 511 aminoácidos con 14 segmentos transmembranales. Filogenéticamente, *qepA* pertenece a una familia de transportadores transmembranales de Actinomicetos Gram positivos pero no de bacterias Gram negativas. Yamane y colaboradores encontraron que *qepA* clonado en pSTV28 incrementa la CMI de ácido nalidíxico, ciprofloxacino y norfloxacino en 2, 32 y 64 veces respectivamente en una cepa de *E. coli*; dos veces el incremento fue observado en eritromicina, acriflavina y bromuro de etidio (Strahilevitz. *et al.*, 2009).

4. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos naturales o semisintéticos de estructura eterocíclica, primariamente bactericidas (a excepción de la estreptomina) de amplio espectro que actúan inhibiendo la correcta síntesis proteica y que precisan, para su correcta acción, encontrar a las bacterias en su fase de crecimiento.

Los aminoglucósidos son poliheterósido, con la excepción de la espectinomicina que es un verdadero aminociclitol, sus principales aglicones proceden de la estreptamina, que es un derivado del inositol o cicloexano.

4.1 Mecanismo de acción

Los aminoglucósidos causan errores traduccionales e inhiben la traducción del ARN mensajero. Sus sitios blancos incluyen dominios ribosomales en los cuales la unión del codón-anticodón es escindida, en particular su unión a un dominio altamente conservado del 16S RNA, el cual induce alteraciones en las funciones ribosomales.

4.2 Mecanismos de resistencia

Hay tres mecanismos conocidos de resistencia a los aminoglucósidos en las bacterias patógenas humanas: (i) decremento de la concentración intracelular del antibiótico por alteración de la permeabilidad de la membrana externa, (ii) disminución de los transportadores de membrana o bombas de eflujo; modificación del sitio blanco por mutaciones en las proteínas ribosomales o el 16S RNA; y (iii) modificación enzimática de la droga, que es el mecanismo más común (Galimand *et al.*, 2003).

5. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son agentes de amplio espectro debido a la actividad que presenta frente a una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, organismos atípicos como clamidias, micoplasmas y rickettsias, protozoos y parásitos. Las propiedades antimicrobianas favorables de estos agentes y la ausencia de grandes efectos secundarios adversos han conducido a su amplio uso en la terapia de infecciones humanas y animales (Chopra y Robert, 2001).

Las moléculas de tetraciclina comprenden un núcleo tetracíclico lineal (anillos designados como A, B, C, y D) al que están unidos una variedad de grupos funcionales (figura 6). Su estructura química es la que le da la propiedad de ser fuertes agentes quelantes (Blackwood *et al.*, 1985) y tanto sus propiedades antimicrobianas y farmacocinéticas están influenciados por la quelación de iones metálicos.

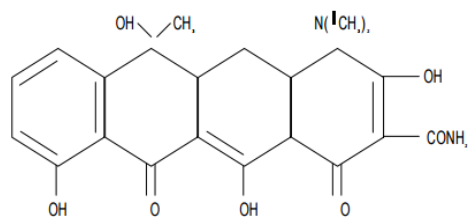


Figura 6. Estructura química de las tetraciclinas.

5.1 Mecanismo de acción

Las tetraciclinas atraviesan la membrana externa de las bacterias Gram negativas a través de los canales de porina OmpF y OmpC. En el citoplasma, se unen a la subunidad ribosomal 30S donde la proteína S7 y las bases G693, A892, U1052, C1054, G1300 y G1338 del 16S ARNr contribuyen al sitio de unión. Por lo tanto, inhiben la síntesis de proteínas mediante la prevención de la unión del aminoacil-ARNt al sitio (A) aceptor del ribosoma (Chopra *et al.*, 1992).

5.2 Resistencia a tetraciclinas

5.2.1 Proteínas de eflujo

Las proteínas Tet codificadas en los genes *tet* son las mejor estudiadas. Estas bombas pertenecen a la superfamilia de más de 300 proteínas individuales. La exportación de tetraciclina reduce la concentración intracelular de los fármacos y de este modo protege a los ribosomas dentro de la célula.

Cada uno de los genes *tet*, codifica una proteína de eflujo de aproximadamente 46-kDa unido a la membrana. Estas proteínas se han dividido en seis grupos en base a una identidad de secuencia de aminoácidos. El grupo 1 contiene Tet (A), Tet (B), Tet (C), Tet (D), Tet (E), Tet (G), Tet (H), Tet (Z), y probablemente Tet (I), Tet (J), y Tet (30). Las proteínas de resistencia a la tetraciclina en este grupo tienen entre 41 al 78% de identidad de aminoácidos. En este grupo, las proteínas tienen aproximadamente 12 dominios transmembrana alfa-hélices con largos bucles citoplásmicos. Del grupo 1, solo el Tet (Z) se encuentra en las Gram positivas; los demás sólo se encuentran en las bacterias Gram negativas (Chopra y Robert, 2001).

6. Plásmidos y la diseminación de la resistencia

Los plásmidos representan el mayor obstáculo para contrarrestar el problema de la diseminación de la resistencia antimicrobiana. Éstos contribuyen a la diseminación de determinantes de resistencia además de factores de virulencia y sistemas adicionales que promueven su estabilidad y mantenimiento en la bacteria hospedera, en diferentes condiciones ambientales.

Los plásmidos son moléculas de ADN extracomosómicos autorreplicativos en los cuales puede estar codificado numerosos genes que confieren ciertas ventajas a las bacterias que

los adquieren. En los plásmidos, encontramos genes que codifican numerosos factores de virulencia, toxinas y hasta genes implicados en el metabolismo bacteriano (Carattoli, 2009).

Algunos plásmidos adquieren elementos genéticos móviles (secuencias de inserción, transposones, integrones) que movilizan genes de resistencia entre diferentes especies bacterianas dependiendo de su rango de hospedero, propiedades conjugativas y eficiencia de conjugación. Los plásmidos que confieren resistencia a los antibióticos, generalmente son grandes (>50Kb) (Carattoli, 2013; Thomas y Nielsen, 2005).

6.1 Replicación

La replicación de plásmidos requiere la presencia de las proteínas codificada por los genes *oriV* y *tra*. Existen dos modelos generales de replicación: la replicación THETA (encontrado comúnmente en la mayoría de los plásmidos de bacterias Gram negativas) y la replicación por círculo rodante (encontrado en algunas bacterias Gram positivas). Para su autotransferencia a otra célula, el plásmido requiere tanto del origen de replicación (Ori) como de la proteína de iniciación de la replicación (Rep). Un plásmido puede tener uno o más orígenes de replicación. La proteína Rep, se une al origen de replicación resultando en el plegamiento y separación de la hebra de DNA. Esto facilita la unión de la ADN helicasa y primasa, las cuales permiten la actividad de la ADN polimerasa resultando en la replicación de un plásmido (Kollek *et al.*, 1978; Couturier *et al.*, 1988).

6.2 Clasificación plasmídica por grupos de incompatibilidad

El estricto control de la replicación implica que dos plásmidos que tienen el mismo sistema de replicación, no pueden ser propagados establemente en la misma línea celular (Carattoli, 2013). Este fenómeno es conocido como incompatibilidad de plásmidos: la incompatibilidad es una manifestación de las relaciones de las secuencias que controlan la replicación y han sido usadas para clasificar plásmidos en grupos homogéneos (grupos de incompatibilidad, Inc). Los plásmidos que llevan el mismo sistema de control son incompatibles, mientras que plásmidos con diferente sistema de control de la replicación son compatibles. Otras clasificaciones se basan en el rango de hospedero y el sistema de toxina-antitoxina.

6.2.1 Clasificación por grupo de incompatibilidad mediante tipificación de plásmidos por PBRT (PCR based replicon typing)

La clasificación por grupos de incompatibilidad se basa en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de iniciación de la replicación (Rep) (*replicon typing*).

Desde 2005, un esquema para la tipificación de replicones basado en PCR (PBRT: *PCR based replicon typing*, por sus siglas en inglés) está disponible, el cual busca identificar el mayor número de replicones presentes en los plásmidos de la familia *Enterobacteriaceae* (HI2, HI1, I1-I γ , X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O) y también incluye ensayos de PCR (PCRs FrepB y FIIAs) detectando las variantes FII, FIII, FIV y FIV y el replicón FII del plásmido de virulencia de *Salmonella*.

La clasificación de plásmidos por PBRT ha sido muy efectiva. Sin embargo, el método tiene limitaciones importantes: (i) Algunos plásmidos tienen múltiples replicones, y esto dificulta la clasificación de plásmidos en un solo grupo de replicón; (ii) la información detallada sobre los grupos Inc o tipos de Rep es limitada entre varios grupos taxonómicos bacterianos especialmente el de las enterobacterias y esto dificulta la identificación de regiones de replicación de otros tipos de plásmidos (Shintani, *et al.*, 2015).

6.2.2 Tipificación de plásmidos basados en su movilidad

La clasificación de plásmidos basado en su movilidad puede resolver los problemas antes mencionados del método PBRT porque: en primer lugar, la clasificación por tipos MOB [dominio MOB (*Mobility*) de la relaxasa] puede cubrir casi la totalidad de plásmidos microbianos y en segundo lugar, los plásmidos raramente llevan más de un gen de relaxasa, enzima que corta el enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos, separando las hebras del plásmido conjugativo en una secuencia particular denominada oriT (Shintani *et al.*, 2015). Las relaxasas son proteínas multidomínios y su actividad reside en su dominio N-terminal. La estructura tridimensional muestra cuatro dominios de la proteína relaxasa: el dominio relaxasa MOB_F, TraI_F, MOB_Q y MOB_V (Alvarado *et al.*, 2012). La relación evolutiva entre las secuencias de las relaxasas ha permitido distribuirlas en seis subfamilias MOB.

Alvarado y colaboradores desarrollaron un método con oligonucleótidos degenerados para la identificación de las diferentes familias basado en la filogenia de éstas proteínas. El método fue llamado "*Degenerate Primer MOB Typing* (DPMT).

En la figura 7 se muestran las subfamilias MOB que se identifican con el método DPMT y la relación que guardan algunas de éstas subfamilias con la clasificación por grupos de incompatibilidad.

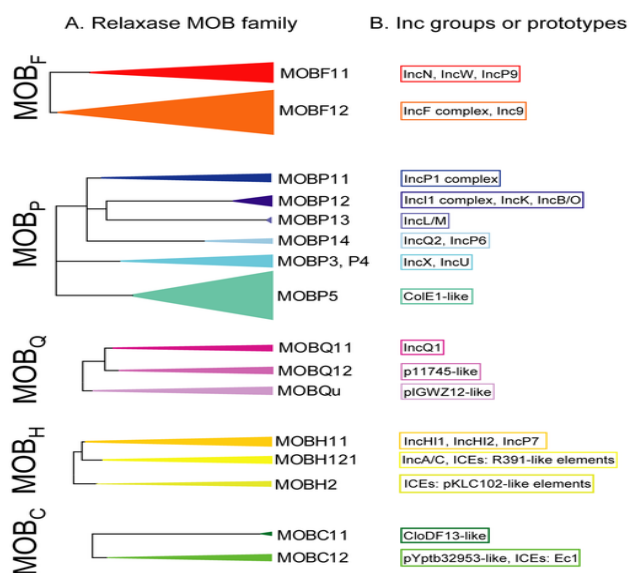


Figura 7. Subfamilias MOB por DPMT y su correspondencia con los tipos Rep. (Alvarado, *et al.*, 2012)

ANTECEDENTES

Antecedentes generales

Como hemos visto en la introducción, los mecanismos de resistencia hacia los antibióticos en muy amplio y en las últimas décadas se ha observado un rápido incremento de las infecciones causadas por microorganismos multidrogo-resistentes con especial énfasis los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Desafortunadamente, esos aislados poseen genes que codifican para β -lactamasas de espectro extendido (por ejemplo, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}) o AmpCs mediados por plásmidos (por ejemplo, *bla*_{CMY}) que confieren resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (Lupo *et al.*, 2013). Además, generalmente tienen asociados otros mecanismos de resistencia, por ejemplo a quinolonas (por ejemplo, mutaciones en *gyrA* y *parC*, elementos *qnr*) y aminoglucósidos (por ejemplo modificaciones enzimáticas de aminoglucósidos y 16 ARNr metilasas). Por otro lado también está el rápido incremento de *Enterobacteriaceae* portadoras de genes que confieren resistencia a carbapenémicos (por ejemplo, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}). Por lo tanto la diseminación de estos patógenos limita las opciones de tratamientos con antibióticos. Desafortunadamente las técnicas de identificación de estos mecanismos de resistencia, hoy en día son muy costosos y limitan un rápido tratamiento con el antibiótico correcto.

Existen numerosos estudios alrededor del mundo que ponen de manifiesto éste problema de Salud Pública mundial, de los cuales algunos son mencionados a continuación.

Tras una revisión de estudios realizados en Europa por Carmen Torres y Mariam Zarazaga en 2007, muestra que fue en 1998 cuando se aisló por primera vez una cepa bacteriana de origen animal portadora de BLEE (*E. coli* productora de SHV-12), y desde entonces se ha observado un alarmante incremento de la detección de BLEE, principalmente CTX-M, en cepas de *E. coli* en animales sanos destinados al consumo humano y en menor medida en animales de compañía, e incluso en animales salvajes. Según los datos publicados hasta 2007, las BLEE detectadas en *E. coli* de animales fueron: el 79% del tipo CTX-M (variantes CTXM- 1, -9, -14, -15, y -32 en Europa, y CTX-M-2, -3, -13, -14, -24, y -27 en Asia), el 15% del tipo SHV (variantes SHV-12, -2 y -5 en Europa), y el 6% del tipo TEM (variante TEM-52 en Europa). Respecto a las BLEE descritas en *Salmonella* aisladas de animales y alimentos: el 55% fue de tipo CTX-M (variantes CTX-M-2, -9 y -32 en Europa), el 33% de tipo TEM (variante TEM-20, y -52 en Europa) y el 12% de tipo SHV (variantes SHV-2, -12 en Europa y Asia). La mayoría de las BLEE en *E. coli* son CTX-M-14, CTX-M-1 y en menor medida SHV-12, y en *Salmonella* CTX-M-9, TEM-52 seguidas de CTX-M-2. Estos datos sugieren una cierta asociación entre la variante de CTX-M detectada en cepas de *E. coli* y las variantes en las cepas de origen animal: CTX-M-14 es mayoritaria en aves, CTX-M-1 en ganado porcino y CTX-M-2 en vacuno. Estos datos nos hablan de que el intestino de animales sanos es un buen reservorio de bacterias portadoras de CTX-M, principalmente *E. coli*, lo cual no descarta la posible transferencia al hombre por la cadena alimenticia (Torres, 2007)

En 2016, Koovapra y colegas, reportan la presencia de 23 aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasa de espectro extendido en 340 muestras de las cuales 129 eran muestras de leche de vacas sanas y 159 eran de vacas con mastitis subclínica y 52 con mastitis clínicas de tres diferentes estados de la India a saber. Siete de ellos eran productores de β -lactamasa tipo AmpC. La producción de BLEE se detectó con mayor frecuencia en las muestras de leche de vacas con mastitis que las sanas. Los genes de β -lactamasas bla_{CTX-M} , bla_{TEM} y bla_{SHV} se detectaron en 19, 8 y 3 aislamientos, respectivamente. En todos menos uno aislamientos positivos CTX-M, se detectó la plataforma genética *ISEcp1-bla_{CTX-M}-orf477*. Diez de los aislados portan resistencia a quinolonas mediado por plásmidos *qnrS* y 1 aislado poseía *qnrB*. 11 aislados tenían genes de resistencia a sulfonamidas *-sul1* y 12 tenían integrones de clase I. La secuenciación del integrón de clase 1 reveló la presencia de la estructura *dfrA12 / dfrA17* y *aadA2 / aadA5*

que dichos genes confieren resistencia a trimetoprima y aminoglucósidos, respectivamente (Koovapra *et al.*, 2016)

Antecedentes específicos

En 2015, Ben Said y colaboradores, tras realizar un estudio para detectar enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido en vegetales, suelo y agua en granjas en Tunisia, trabajaron con 109 muestras de 18 diferentes granjas (49 de vegetales, 41 de suelo y 19 de agua de riego) y 45 muestras de vegetales de 13 supermercados. Fueron detectadas enterobacterias productoras de BLEE en 10 de las 109 muestras (8.2%, vegetales; 7.3%, suelo; 15.8%, agua), y en 4 de las 45 muestras de los supermercados (8.9%), recuperando 15 enterobacterias productoras de BLEE. Los genes BLEE detectados de los aislados fueron: *E. coli* (n=8: 5 *bla*_{CTX-M-1}, 2 *bla*_{CTX-M-15} y un *bla*_{CTX-M-14}), *Citrobacter freundii* (n=4: 3 *bla*_{CTX-M-15} y un *bla*_{SHV-12}), *Enterobacter hormaechei* (n=2: 2 *bla*_{CTX-M-15}) y *K. pneumoniae* (n=1, *bla*_{CTX-M-15}). La secuencia ISEcp1 fue encontrada río arriba del gen *bla*_{CTX-M} en 13 de las 14 muestras (en tres caso truncado por IS5), y el orf477 o IS903 río abajo. Además, también fueron identificados integrones de clase 1 en 5 de las muestras los cuales portan los cassette génicos *dfrA17-aadA5* y *aadA1*. Muchos aislados mostraron el fenotipo de multirresistencia y todos los positivos a *bla*_{CTX-M-15} portan además la variante cr del gen *aac(6')-1b* (*aac(6')-1b-cr*), que confiere resistencia a amikasina, tobramicina, kanamicina y ciprofloxacino. Cinco de las bacterias productoras de BLEE llevan alguno de los genes de la familia *qnr*, además de 1 a 2 plásmidos fueron detectados en las cepas de *E. coli* (63-179 kb). Por último realizaron experimentos de conjugación para comprobar la transferencia de los genes BLEE en las cepas de *E. coli*, encontrando que las transconjugantes adquirieron un plásmido Inc1 de 97 kb que portaba el gen *bla*_{CTX-M-1} (Said *et al.*, 2015). Estos resultados confirman que las enterobacterias productoras de BLEE, son frecuentemente diseminadas en vegetales de granjas y podrían potencialmente ser transmitidas a humanos a través de la cadena alimenticia.

En Japón, Kanamori y cols., en 2011 reportan una alta prevalencia de BLEEs y determinantes Qnr en diferentes especies de *Citrobacter*, demostrando la diseminación de CTX-M-2. De 187 aislados de *C. koseri* (53.7%), 151 de *C. freundii* (43.4%), y 10 de *C. amalonaticus* (2.9%) se obtuvieron 67 aislados de *Citrobacter* spp. productores de BLEE (19.3%) y la prevalencia de productores de BLEE fue mayor en *C. koseri* (60/187, 32.1%) que en *C. freundii* (7/151, 4.6%). En *C. amalonaticus* no se encontraron cepas productoras de BLEE. En cuanto a la distribución del genotipo BLEE se encontró que de los 67 aislados

productores de BLEE, 50 (74.6%), 12 (17.9%) y 25 (37.3%) poseían *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}, respectivamente. Tras la secuenciación encontraron que 46 (92.0%) de los 50 aislados positivos a *bla*_{CTX-M} tenían CTX-M-2, seguido por 3 con CTX-M-15 y 2 con CTX-M-14. Todos los aislados positivos a *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} tenían SHV-2 y TEM-1, respectivamente (Kanamori *et al*, 2011)

En 2010, Poirel y cols., reportan un caso de una cepa de *Citrobacter freundii* extremadamente resistente aislada del urocultivo de una mujer francesa de 18 años de edad, la cual era resistente a todos los β-lactámicos incluyendo a los carbapenémicos imipenem, meropenem y ertapenem. En esta cepa se identificaron varios genes de resistencia para metalo-β-lactamasas *bla*_{NDM-1} y *bla*_{VIM-4}, *bla*_{OXA-181}, además de genes tipo BLEE como *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-9}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{TEM-1} y *bla*_{CMY} (Poirel *et al*, 2011).

En 2010, Pan y cols., reportan la coexistencia de múltiples genes de resistencia a antimicrobianos en un aislado clínico de *C. freundii* carbapenem-resistente en China. En este trabajo se encontraron genes de resistencia como *bla*_{KPC-2}, al mismo tiempo realizaron PCR multiplex para la determinación de genes de resistencia a quinolonas encontrando los *qnrA* y *qnrB* así como la acetilasa *aac(6′)-Ib-cr*, los genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-14}. Además de una nueva variante del gen *bla*_{CMY} designada como CMY-49 (Pan *et al.*, 2010)

En una colección de 40 aislados confirmados de *Citrobacter* spp., obtenidos de 5, 732 cultivos clínicos de 2006 a 2008, se estudió la presencia de los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{AmpC} por PCRs simplex y múltiplex. Los aislados fueron también sometidos al estudio de la presencia de los elementos de inserción IS26 y orf513, los cuales juegan un papel importante en la diseminación de genes de resistencia. Los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{AmpC} fueron encontrados en un 67.5%, 40%, 25% y 40% respectivamente en los aislados. La secuenciación de CTX-M reveló la presencia de la variante CTX-M-15. También fue identificado el gen *sul1* y un plásmido de 22 kb que albergaba genes de resistencia. En todos los aislados de *Citrobacter* spp. se amplificó un fragmento de 400 pb correspondiente a la IS26 por PCR, similar a la clona A de *E. coli* productora de CTX-M-15 que predomina en el Reino Unido, sugiriendo una posible relación genética entre ambas bacterias (Shahid, 2010) Este fue el primer reporte de una cepa de *Citrobacter* spp. portadora de CTX-M-15 en la India y también el primer reporte que describe estos genes en integrones de clase 1. Además este hallazgo indica que el entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} ha cambiado a la inserción de IS26 y orf513, además las consecuencias de este evento permanece incierto.

En México son pocos los estudios, sin embargo se ha reportado la prevalencia de diferentes mecanismos de resistencia a las diferentes familias de antibióticos en diversas muestras predominando las clínicas principalmente. Estos estudios son de gran importancia debido a la información que proveen en este campo. A continuación se mencionan algunos de los trabajos realizados en México.

En 2013, Silva Sánchez y colegas reportaron un estudio multicéntrico de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE asiladas (aisladas de 1996 a 2011) de muestras pediátricas de diferentes hospitales (Hospital Civil de Guadalajara en Jalisco; Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI en la ciudad de Mexico; Hospital General de Tapachula Chiapas en Tapachula, Chiapas; Hospital del Niño en Villahermosa, Tabasco y Hospital Universitario in Monterrey, Nuevo León, encontraron una prevalencia de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos del 32,1%, y la tasa de aislamientos qnr-positivo fue del 15,1%; 93,3% de estos últimos eran *qnrB* y el 6,4% eran *qnrA1*. La distribución de los aislamientos en términos de especies bacterianas fue la siguiente: 23,5% (4/17) correspondió a *E. cloacae*, el 13,7% (7/51) de *K. pneumoniae*, y 13,6% (6/44) para *E.coli*. Además, la prevalencia de *aac (6') -Ib-cr* y *qepA* fue del 15,1% y 1,7%, respectivamente. La BLEE CTX-M-15 fue la más prevalente (70,5%), y después SHV-12 en el caso de cepas positivas para *aac (6')-Ib-cr*. Las mutaciones en GyrA fueron en los codones Ser-83 y Asp-87, y en ParC en los codones Ser-80, en el 41,1% y el 35,2% de las cepas positivas a *qnr*, respectivamente (Silva-Sanchez *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por Garza-Ramos y colegas en México, reportado en 2015, encontraron una prevalencia de 36.2% de las carbapenemasas IMP, VIM y tipo GES en 124 aislados clínicos de *P. aeruginosa*. De éstas carbapenemasas, GES-19 y GES-20 fueron las más prevalentes, además éstas carbapenemasas fueron identificadas en tándem (GES-19-GES20) en tres diferentes integrones de clase 1 con diferente arreglo de genes [In768 (*aacA42*, GES-19, GES-20, *aacA4*, OXA-2, *aadA1*), and In783 (*aacA42*, GES-19, GES-20, *aadA1*), encontrándolas en un 84.4% de los aislados positivos a carbapenemasas, después fue la β -lactamasa IMP. Éstos genes encontrados, fueron localizados en integrones de clase 1 codificados en el cromosoma de éstos aislados (Garza-Ramos *et al.*, 2015)

Además de la caracterización de aislados de muestras clínicas, se ha realizado la caracterización de otro tipo de aislamientos como se muestra en el siguiente trabajo.

Rocha-Gracia y colegas, en 2015 reportan la prevalencia de las β -lactamasas CTX-M-15 y CMY-2 en muestras fecales de 53 perros sanos. Detectaron en 3/53 muestras (6%) *E. coli* productor de BLEE; estos aislados llevan el gen *bla*_{CTX-M-15} y un aislamiento también porta *bla*_{SHV-2}. Los tres aislados de *E. coli* BLEE positivos se identificaron como pertenecientes al filogrupo A y tipos de secuencia ST617, ST410 y ST3944. Por otro lado, 6/53 (11%) muestras contenían el gen *bla*_{CMY-2}, que codifica la β -lactamasa CMY-2. Estos seis aislamientos pertenecían a los filogrupos A (n = 2), B1 (n = 1) y D (n = 3). Cinco aislados de *E. coli* tienen integrones de clase 1 y un aislamiento porta un integrón de clase 2. Además, los genes *aac* (6 ') *Ib-cr*, *aac* (3) -II, *qnrB19*, *tet* (A) y *tet* (B) también fueron detectados así como los genes *cmlA*, y *su13* (Rocha-Gracia, 2015).

Cortés-Cortés y colaboradores, reportaron recientemente la prevalencia de 11 aislados de *E. coli* aislados de muestras cloacales de 71 (15.5%) tortugas protegidas en un herpetario en México. En éstas cepas se detectaron BLEE en cuatro muestras (5,6%): de las cuales dos cepas llevan el gen *bla*_{CTX-M-2} y dos contenían el gen *bla*_{CTX-M-15}. El gen *bla*_{CMY-2} fue detectado por PCR en 8 muestras (9,8%) que se distribuyeron en los filogrupos A (n = 1), B1 (n = 6), y D (n = 1). También se determinó la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR) y éstos fueron detectados en cinco aislamientos [*AAC* (6 ') *Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB19*, y *oqxB*]. Además se identificaron los replicones IncFIB, IncI1, IncFrep, y IncK. Por último los genes BLEE o pAmpC fueron transferidos por conjugación en cuatro cepas, y los genes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CMY-2} fueron localizados en plásmidos IncFIB o IncI1 mediante ensayos de hibridación de Southern blot. Éste reporte constituye el primero en reportar la prevalencia de BLEE y CMY-2 en cepas aisladas de tortugas (Cortés-Cortés *et al*, 2016)

Antecedente directo

En 2014, en la tesis de licenciatura "Caracterización de la resistencia a β -lactámicos e cepas de *Citrobacter* spp., de origen clínico y alimentario", en la cual se trabajó con 14 cepas, se identificaron dos cepas portadoras de CTX-M y dos más con SHV y TEM, además se observó resistencia intermedia al carbapenémico imipenem en algunas cepas y una resistencia del 92.85% a cefoxitina, así como resistencia a quinolonas (42.85%) y aminoglucósidos (64.28%), por lo que se decidió seguir caracterizando estas cepas en el presente trabajo para tener un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia en estas cepas de *Citrobacter* spp.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, tras el uso indiscriminado de los antimicrobianos para tratar enfermedades infecciosas tanto en la clínica humana como veterinaria y el amplio uso como promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano, se ha ejercido una presión selectiva de microorganismos capaces de evadir el efecto de muchos antibióticos (resistencia bacteriana), incluyendo aquellos denominados de última elección, los carbapenémicos.

A pesar de que muchos de los mecanismos involucrados en la resistencia bacteriana son bien conocidos, y en muchos países existe información detallada del comportamiento de éste fenómeno, en México, la información acerca de este fenómeno es muy escasa y los pocos estudios al respecto están centrados en aislados clínicos en microorganismos de importancia médica.

Por otro lado, en México como en otros países, los estudios respecto a la resistencia bacteriana en aislados bacterianos de alimentos son muy escasos, limitando el conocimiento sobre la frecuencia y características genéticas involucradas en la resistencia de cepas bacterianas que circulan en alimentos de consumo humano que pudieran ser el vehículo y/o reservorio de éste tipo de microorganismos multidrogosresistentes.

Por lo anterior, el presente estudio buscó poner de manifiesto la presencia de mecanismos moleculares de resistencia en cepas aisladas de alimentos, acercarse al

panorama actual sobre el fenómeno de la resistencia en este tipo de cepas y evidenciar la presencia de genes intrínsecos y adquiridos involucrados en la resistencia a β -lactámicos, quinolonas y otros antibióticos en la ciudad de Puebla.

Además el presente trabajo busca contribuir a las recientes modificaciones en las normas para el uso de antibióticos en México ofreciendo información que sustenta dichas modificaciones para tratar de regular el uso de antibióticos en nuestro país y así contribuir a evitar la disminución de la presión selectiva ocasionada por el uso indiscriminado de los antibióticos.

OBJETIVO GENERAL

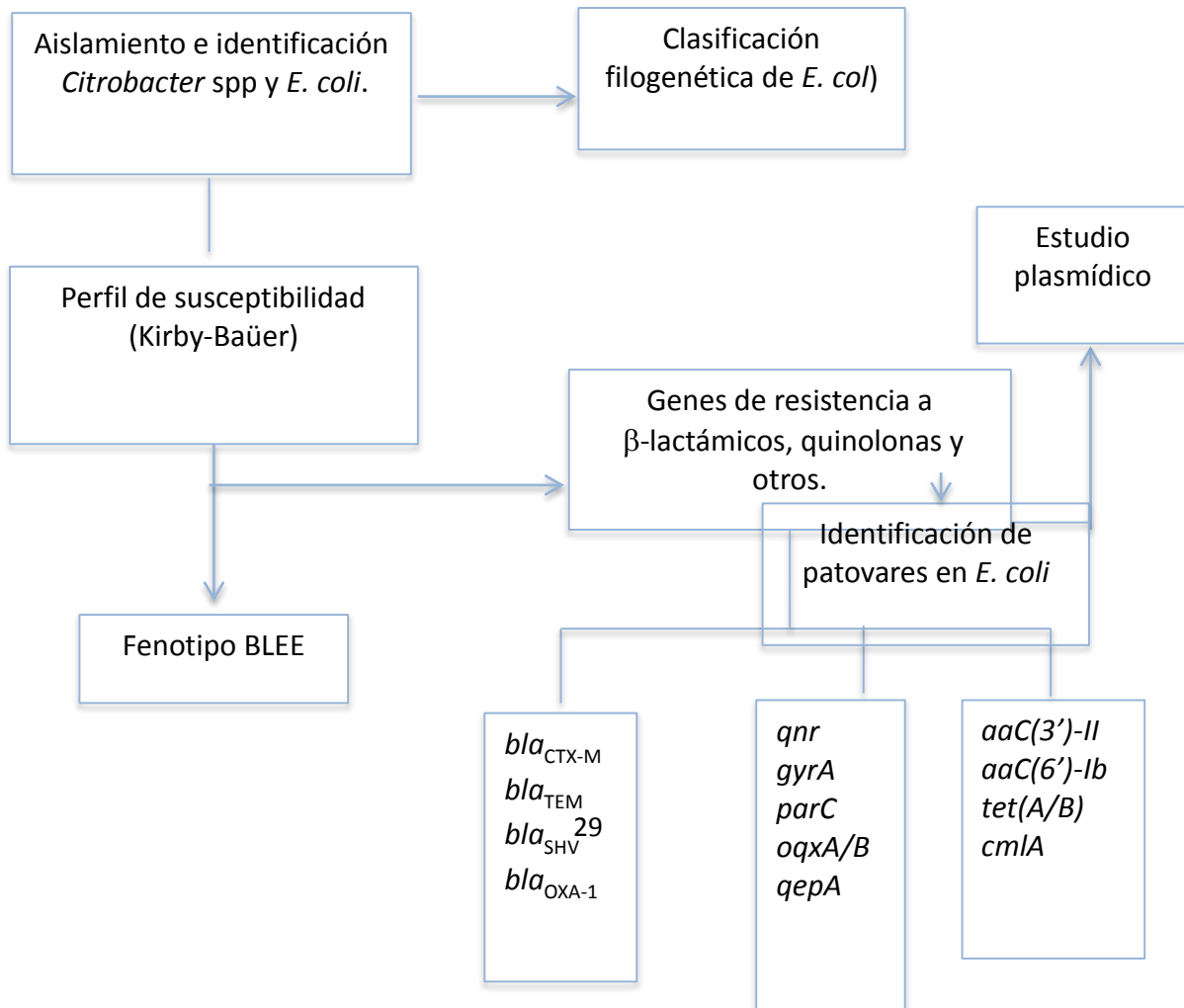
Caracterizar la resistencia molecular hacia antibióticos β -lactámicos y quinolonas, en cepas de *Citrobacter* spp., y *Escherichia coli* aisladas de alimentos de algunos municipios del estado de Puebla.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar cepas de *Citrobacter* spp. y *E. coli*, a partir de muestras de leche, carne y verduras crudas.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad a antibacterianos y caracterizar fenotípicamente la producción de BLEE.
3. Determinar el patotipo diarraegénico y realizar la clasificación filogenética de *E. coli*.
4. Identificar genes que codifican para las BLEE y β -lactamasas tipo AmpC.
5. Identificar genes que codifican para β -lactamasas con actividad carbapenemasa como IMP, GES y KPC en aquellas cepas resistentes a carbapenémicos.

6. Identificar genes plasmídicos (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, variante *acc(6')-Ib-cr*, *qepA* y *oqxA/B*) y mutaciones en los genes cromosómicos (*parC*, *gyrA*) involucrados en la resistencia a quinolonas.
7. Identificar genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol.
8. Determinar el perfil plasmídico de algunas cepas multirresistentes de *Citrobacter* spp. y de *E. coli* y caracterizar parcialmente los plásmidos involucrados en la resistencia.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Obtención de muestras

Se emplearon 286 muestras de leche cruda de vaca (animales sanos y con mastitis) provenientes de los municipios del estado de Puebla. Las muestras fueron recogidas bajo condiciones de esterilidad por el médico veterinario zootecnista y posteriormente fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) en donde fueron procesadas para el aislamiento de las cepas de interés para éste trabajo. Además de las muestras de leche, 93 muestras de carne de pollo, 50 muestras de cilantro, coprocultivos de portadores también fueron empleadas.

5 cepas fueron donadas por el Hospital para el Niño Poblano (HNP) las cuales fueron aisladas de diferentes muestras biológicas (datos generales en la tabla 2 en resultados).

Aislamiento

Las muestras de leche cruda fueron descongeladas hasta alcanzar la temperatura ambiente, se agitaron para homogeneizar, se tomaron 10µL de leche y se inocularon en placas de agar Levine suplementado con cefotaxima a una concentración de 2 µg/mL (CLSI, 2015); posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas para seleccionar aquellas bacterias con posible producción de BLEE.

Las cepas de *Citrobacter* spp. fueron aisladas bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente excepto aquellas que fueron donadas por el HNP, las cuales ya se encontraban identificadas mediante el sistema semiautomatizado Vitek 2 y se decidió trabajar con estas cepas a pesar de que algunas no fueran resistentes a cefotaxima.

Identificación bacteriana

La identificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas específicas para Enterobacterias: Agar Hierro Lisina (LIA), Movilidad Indol Ornitina (MIO), Agar Hierro Triple Azúcar (TSI), Citrato (CIT), Fenilalanina (FEN), Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MRVP), Agar Oxidación/Fermentación Entérica con glucosa (OF) y Urea de Christensen (URE) (Anexo 1). Los resultados obtenidos de estas pruebas se compararon con los esquemas de identificación indicados por Cowan y Steel en el manual de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin (MacFaddin, 2003), utilizando la clasificación taxonómica propuesta en la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*).

Adicionalmente se realizó pruebas moleculares empleando la técnica de PCR para la amplificación de un segmento del ADN ribosomal de la subunidad 16S para las cepas de *Citrobacter* spp y el gen *uidA* que codifica para la β-glucuronidasa en *E. coli* (Martins *et al.*, 1993)

Determinación de susceptibilidad a antimicrobianos

Para la determinación de la susceptibilidad a diversas familias de antimicrobianos se siguió la metodología descrita para el método de difusión del disco (Kirby-Baüer) siguiendo las recomendaciones del CLSI 2015 como se muestra en la figura 12. En esta metodología se evaluó la susceptibilidad a 19 antibióticos que se muestran en la tabla 3 los cuales son usados en la práctica clínica humana y veterinaria.

TABLA 1. ANTIBIÓTICOS Y PUNTOS DE CORTE EVALUADOS EN EL PRESENTE TRABAJO EN EL ANTIBIOGRAMA POR KIRBY-BAÜER SEGÚN EL CLSI 2015 PARA ENTEROBACTERIAS.

Familia de antibiótico	Antibiótico		Concentración (µg)	Halos de inhibición		
				S	I	R
β-lactámicos	Ampicilina	AMP	10	≥ 17	14-16	≤ 13
	Amoxicilina/Ácido clavulánico	AMC	20/10	≥18	14-17	≤13
	Piperacilina	PIP	100	≥ 21	18-20	≤ 17
	Piperacilina/Tazobactam	TZP	100/10	≥ 22	18-21	≤ 18
	Aztreonam	ATM	30	≥ 21	18-20	≤ 17
	Cefoxitina	FOX	30	≥ 18	15-17	≤ 14
	Cefotaxima	CTX	30	≥ 26	23-25	≤ 22
	Ceftazidima	CAZ	30	≥ 21	18-20	≤ 17
	Cefepime	FEP	30	≥ 18	15-17	≤ 14
	Meropenem	MEM	10	≥ 23	20-22	≤ 19
	Imipenem	IPM	10	≥23	20-22	≤19
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5	≥ 21	16-20	≤ 15
	Levoflaxina	LVX	5	≥ 17	14-16	≤ 13
	Ácido Nalidíxico	NA	30	≥ 19	14-18	≤ 13
Aminoglucósidos	Gentamicina	GM	10	≥ 15	13-14	≤ 12
	Amikacina	AN	30	≥ 17	15-16	≤ 14
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30	≥15	12-14	≤11
Otros	Trimethoprin/sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	≥ 16	11-15	≤ 10
	Cloranfenicol	C	30	≥18	13-17	≤12

S: sensible, R: resistente, I: intermedio.

Procedimiento

El método utilizado para determinar la susceptibilidad antimicrobiana consistió en preparar una suspensión bacteriana en solución salina isotónica al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, agitándola para resuspender el inóculo. Posteriormente se ajustó la turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) a partir de un cultivo de 18 a 24 horas sembrado en agar Soya tripticaseína (TSA) (BD Bioxon). Se inoculó homogéneamente con un hisopo estéril toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton (Becton Dickison). Posteriormente con ayuda de unas pinzas estériles se colocó los discos con los antibióticos (Becton Dickinson) descritos en la tabla 3 con las concentraciones recomendadas por el CLSI, 2015 (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Por último las placas se incubaron invertidas a 37°C durante 18–24 horas, pasado este tiempo se les midió el halo de inhibición. La interpretación y los puntos de corte utilizados para la evaluación de susceptibilidad a estos antibióticos se realizó siguiendo las normas del CLSI, 2015.

Fenotipo BLEE

Para la determinación del fenotipo BLEE se siguieron dos metodologías diferentes, uno para cada género bacteriano (*E. coli* y *Citrobacter*) debido a la producción inducible de la β -lactamasa AmpC en *Citrobacter*.

Determinación del fenotipo BLEE en las cepas de *E. coli* por la prueba de difusión con doble disco

La detección fenotípica de la producción de BLEE se realizó por la prueba de difusión con doble disco descrita previamente (Jarlier *et al*, 1988), la cual se basa en la observación de un sinergismo entre los antibióticos causado por la inhibición de las β -lactamasas de espectro extendido con los inhibidores ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

El ensayo consiste en colocar un antibiótico impregnado con algún inhibidor y un antibiótico a evaluar a una distancia de 2 a 2.5 cm, de esta forma el inhibidor se une irreversiblemente a la β -lactamasa evitando así la hidrólisis del antibiótico por la enzima. La presencia de una BLEE se confirma por la observación del aumento del halo de inhibición entre el inhibidor y el antibiótico evaluado observando una formación de “cola de pescado” o de “huevo” o una simple ampliación del halo de inhibición.

Procedimiento

Se realizó una suspensión bacteria en solución salina isotónica al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, agitándola para resuspender el inóculo. Posteriormente se ajustó la turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) a partir de un cultivo de 18 a 24 horas sembrado en TSA (BD Bioxon). Se inoculó homogéneamente con un hisopo estéril toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton (BD, Becton Dickison). Posteriormente con ayuda de unas pinzas estériles se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20 μ g/10 μ g) en el centro de la placa y a una distancia de 2 cm se colocaron discos de cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefepime (30 μ g) y aztreonam (30 μ g) y después de 15 minutos las placas se invirtieron y se incubaron a 37°C durante 18-24h. Finalmente se observó el sinergismo de los antibióticos en los halos de inhibición.

Determinación del fenotipo BLEE en las cepas de *Citrobacter* spp.

Para la determinación de la producción de BLEE en las cepas de *Citrobacter* spp. se utilizó la técnica descrita previamente (Coudron, 2005; Jeong *et al*, 2008) la cual se basa en la inhibición de la β -lactamasa AmpC en aquellos microorganismos productores de esta enzima. La β -lactamasa AmpC puede hidrolizar β -lactámicos de primera generación, tras la sobreproducción por inducción o mutación de los reguladores de ésta enzima se pueden observar fenotipos tipo BLEE, es por ello que en ésta técnica se busca inhibir esta enzima para poder observar la presencia de BLEE sin que la enzima AmpC se vea involucrada y se tenga un falso positivo.

El ensayo consiste en utilizar dos discos impregnados con ácido borónico, la cefalosporina de tercera generación y uno de ellos impregnado con el inhibidor de BLEE (ácido clavulánico) colocados a una distancia de 4 cm. El fenotipo BLEE se observa por la inhibición de la BLEE por el ácido clavulánico evitando la hidrólisis del antibiótico lo cual permite al antibiótico ejercer su efecto. Éste se verá reflejado en un aumento en el halo de inhibición a diferencia del otro disco en el cuál la BLEE presente (si la hay) hidrolizará el antibiótico observando un menor halo de inhibición. Por otro lado la hidrólisis del antibiótico no se verá afectada por la presencia de la enzima AmpC ya que se encuentra inhibida por el ácido borónico. El aumento del halo de inhibición en el disco con el antibiótico más el inhibidor BLEE y AmpC mayor o igual a 5mm en comparación con el disco que tiene el inhibidor de AmpC y el antibiótico se tomará como positivo a la producción de BLEE (figura 8).

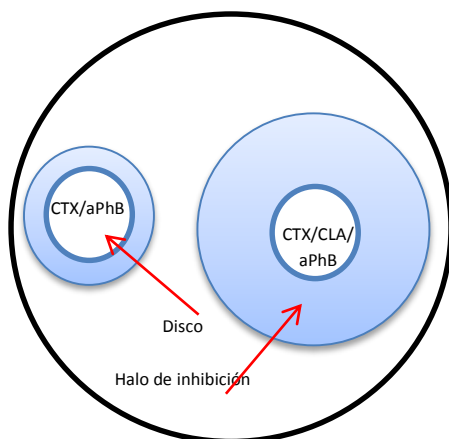


Figura 8. **Fenotipo BLEE en *Citrobacter* spp.** CTX/aPhB: cefotaxima/ácido fenilborónico (inhibidor AmpC); CTX/CLA/aPhB: cefotaxima/ácido clavulánico (inhibidor BLEE)/ácido fenilborónico.

Procedimiento

Se preparó una solución de ácido fenilborónico (aPhB) a una concentración de 20 g/L disolviendo 60 mg de aPhB en 1.5 mL de agua estéril más 1.5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). De esta solución de aPhB se colocaron 20 µL en discos con 30 µg de cefotaxima (CTX/aPhB) y en discos con 30 µg de cefotaxima y 10 µg de ácido clavulánico (CTX/CLA/aPhB) y se dejaron secar y se usaron inmediatamente.

Para la determinación del fenotipo BLEE se realizó una suspensión bacteria en solución salina isotónica al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, agitándola para resuspender el inóculo. Posteriormente se ajustó la turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) a partir de un cultivo de 18 a 24 horas sembrado en agar TSA (BD Bioxon). Se inoculó homogéneamente con un hisopo estéril toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton (BD, Becton Dickison).

Posteriormente con ayuda de unas pinzas estériles se colocó un disco de CTX/aPhB en un extremo de la placa y en el otro extremo un disco de CTX/CLA/aPhB y después de 15 minutos se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C durante 18-24h. Finalmente se midieron los halos de inhibición alrededor de ambos discos y una diferencia mayor o igual a 5 mm en el halo producido por el disco de CTX/CLA/aPhB contra el halo producido por el disco de CTX/aPhB se consideró un resultado positivo para la producción de BLEE.

Caracterización molecular de la resistencia

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de una sola copia. Ésta técnica fue empleada para realizar la caracterización molecular de los genes de interés en las cepas de *Citrobacter* spp. y *E. coli*. Éstos se mencionan a lo largo de la metodología siguiente.

Para poder realizar la PCR, se parte de la obtención de un templado de ADN de la cepa de interés, existen varios métodos de extracción de ADN, sin embargo uno de los más usados es el método de hervido el cual se fundamenta en la ruptura celular por choque térmico y se separan los diferentes componente obtenidos mediante sedimentación por centrifugación, el ADN al ser soluble queda en el sobrenadante el cual es recuperado. Éstos lisado fueron usados para todas las PCR en este trabajo (salvo en algunas excepciones donde se especifica) y el método se menciona a continuación.

Extracción de ADN por el método de hervido

Se partió de la descongelación a temperatura ambiente de la cepa de interés, la cual se sembró en placas de TSA. Se inoculó una asada por estría cruzada y se incubó a 37°C durante 18-24h. Una vez confirmada la pureza de la cepa se sembró masivamente en otra placa de TSA y tras la incubación de 18-24h a 37°C se cosechó una asada en 800 µL de agua estéril y se homogeneizó. Los tubos eppendorf fueron sometidos a ebullición durante 10 minutos, después se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se centrifugó a 13 mil rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió en tubos nuevos y se ajustó la concentración de DNA a 200-400 ng/µL con el equipo NanoDrop (marca y modelo).

Volumetría de los componentes usados en la PCR

Las cantidades de los componentes para PCR en este trabajo se muestran en la tabla 2. Por último, todas las reacciones de PCR se amplificaron en el termociclador Professional TRIO® en un volumen de 10µL.

TABLA 2. VOLUMETRÍA DE LOS COMPONENTES DE PCR

Reactivo	Concentración comercial	Cantidad para 10 µL de reacción	Concentración final
Agua inyectable	---	6.6	---
Buffer	10 x	1	1 X
MgCl ₂	25 mM	1	2.5 mM
Mezcla de dNTPs	10 mM	0.4	0.4 mM
Oligonucleótidos	25 µM	0.3(X2)	2.5 µM
Taq Polimerasa	5 U/µL	0.1	0.05 U/mL
ADN	300 nM/µL	0.3	9 nM/µL
Volumen total	---	10	

Determinación del grupo filogenético en las cepas de *E. coli*

Primero se realiza una PCR cuádruplex como se muestra en la figura 9 para amplificar los genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* y *arpA*, una vez teniendo estos resultados y basándonos en el perfil como se describe en la tabla 3, se procede a realizar la amplificación con oligonucleótidos específicos para el grupo filogenético E y otra PCR con oligonucleótidos específicos para el grupo filogenético C.

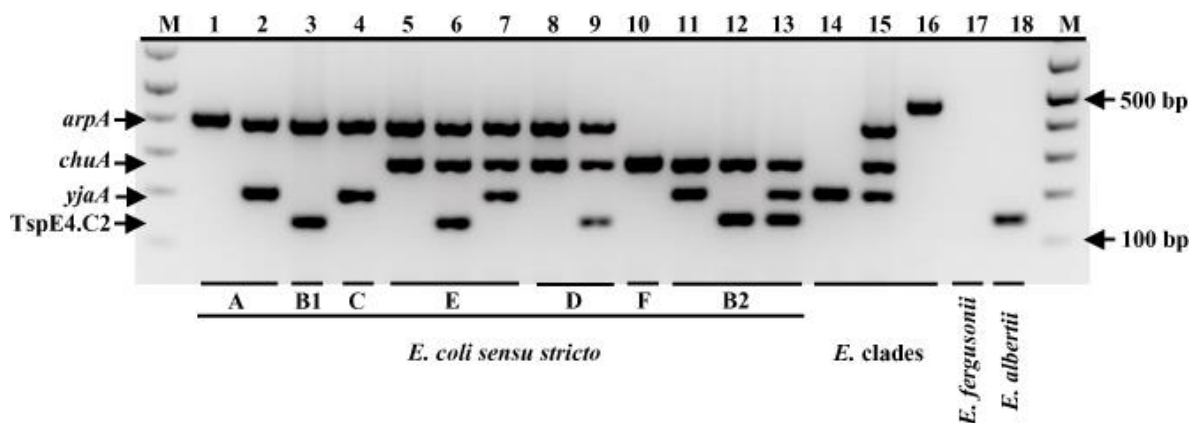


Figura 9. Perfil electroforético de la PCR cuádruplex para la identificación de los filogrupos en *E. coli*. (tomada de Clermont *et al.*, 2013).

TABLA 3. ALGORITMO PARA LA ASIGNACIÓN DEL GRUPO FILOGENÉTICO EN *E. coli*

Cuádruplex				Filogrupo	Confirmación
<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Puede ser confirmado con el gen <i>ibeA</i>
+		+	-	A o C	Discriminar usando los primers específicos para C.
+	+	-	-	D o E	Discriminar usando los primers específicos para E
+	+	-	+	D o E	
+	+	+	-	E o Clado I	Usar primers específicos para E, si es negativo usar primers para clado críptico
-	-	+	-	Clado I o II	Discriminar usando primers para clado críptico

+: amplificación positiva; -: No hay amplificación. Tomada de..... o poner la referencia.

Los oligonucleótidos usados se mencionan en la tabla 4 así como las condiciones en la tabla 5.

TABLA 4. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA REALIZAR LA CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA

Reacción de PCR	Nombre	Secuencia	Blanco	TA (Pb)	Referencia
Cuádruplex	<i>chuA.1b</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	<i>chuA</i>	288	Clermont <i>et al.</i> , 2013
	<i>chuA.2</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			Clermont <i>et al.</i> , 2000

	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	<i>yjaA</i>	211	Clermont <i>et al.</i> , 2013
	yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
	TspE4C2.1b	CACTATTGTAAGGTCATCC	TspE4C2	152	Clermont <i>et al.</i> , 2013
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC			Clermont <i>et al.</i> , 2013
	ArpA1.r	TCTCCCATACCGTACGCTA	<i>arpa</i>	400	Clermont <i>et al.</i> , 2004
Grupo E	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC			
	ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	<i>arpa</i>	301	Lescat <i>et al.</i> , 2012
Grupo C	trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCAG			
	trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCC	<i>trpA</i>	219	Lescat <i>et al.</i> , 2012
Control interno	trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC			
	trpBA.r	GCAACGCGCCTGGCGGAAG	<i>trpA</i>	489	Clermont <i>et al.</i> , 2008

TA: tamaño del amplificado.

TABLA 5. CONDICIONES USADAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES COMO MARCADORES MOLECULARES PARA LA CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE *E. coli*

PCR	Gen	Nombre del oligonucleótido	DI	Ciclos de amplificación			EF
Cuádruplex	<i>chuA</i>	chuA.1b	94°C/ 4min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C / 5seg 59°C / 20seg 72°C / 30seg	72°C/ 5min
		chuA.2					
	<i>yjaA</i>	yjaA.1b					
		yjaA.2b					
	TspE4C2	TspE4C2.1b					
		TspE4C2.2b					
<i>arpa</i>	AceK.f						
	ArpA1.r						
Específico para el grupo E	<i>arpa</i>	ArpAgpE.f	94°C/ 5min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C / 5 seg 57°C / 20 seg 72°C / 30seg	72°C/ 5min
		ArpAgpE.r					
	<i>trpA</i>	trpBA.f					
trpBA.r							
Específico para el grupo C	<i>trpA</i>	trpAgpC.1	94°C/ 5min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C / 5 seg 59°C / 20 seg 72°C / 30 seg	72°C/ 5min
		trpAgpC.2					
	<i>trpA</i>	trpBA.f					
		trpBA.r					

DI: desnaturalización inicial; EF: extensión final; seg: segundos; min: minutos. Referencia....

Determinación del patovar en las cepas de *E. coli*

Para evaluar la presencia de cepas patógenas de *E. coli* en los aislamientos de muestras alimentarias, se realizó la determinación del patovar diarregénico en las cepas de *E. coli*,

para ello se utilizaron juegos de oligonucleótidos descritos anteriormente (Panchalingam *et al.*, 2012; Gomez-Duarte *et al.*, 2010) los cuales se describen en la tabla 6 para amplificar por PCR genes que codifican para determinantes de virulencia descritos para cada patovar (EPEC, EPEC, EAEC, EHEC, DAEC y EIEC). Éste método consiste en la realización de PCRs múltiplex (las condiciones de cada PCR se muestran en la tabla 7) para las cuales se utilizó ADN extraído por el método de hervido (mencionado anteriormente) y ADN genómico para la confirmación de aquellas cepas que mostraran un perfil electroforético similar al de los controles positivos pero diferían en el tamaño del amplificado.

TABLA 6. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL PATOVAR DIARREAGÉNICO EN LAS CEPAS DE *E. coli*

PCR	NO	Secuencia	Gen blanco	TA (Pb)	Patotipo	Referencia
1	LT-F	CACACGGAGCTCCTCAGTC	<i>elt</i>	508	EPEC	Panchalingam et al., 2012
	LT-R	CCCCAGCCTAGCTTAGTTT				
	ST-F	GCTAAACCAGTARGGTCTTCAAAA	<i>est</i>	147		
	ST-R	CCCGGTACARGCAGGATTACAACA				
	BFPA-F	GGAAGTCAAATTCATGGGGG	<i>bfpa</i>	367	EPEC	
	BFPA-R	GGAATCAGACGCAGACTGGT				
	EAE-F	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	<i>eae</i>	881		
	EAE-R	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG				
	CVD432-F	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	<i>aatA</i>	630	EAEC	
	CVD432-R	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT				
	AAIC-F	ATTGTCCTCAGGCATTTAC	<i>aaiC</i>	215		
AAIC-R	ACGACACCCCTGATAAACA					
2	EAE2-F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	<i>eae</i>	384	EPEC	
	EAE2-R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG				
	ehxA-F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	<i>ehxA</i>	534	EHEC	
	ehxA-R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT				
	stx1-F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	<i>stx1</i>	180		
	stx1-R	AGAACGCCCACTGAGATCATC				
	stx2-F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	<i>stx2</i>	255		
stx2-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG					
3	daaE-F	GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA	<i>daaE</i>	542		DAEC
	daaE-R	TATTCACCGGTCGGTTATCAGT				
	ipaH-F	CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG	<i>ipaH</i>	933	EIEC	
	ipaH-R	GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC				

NO: Nombre del oligonucleótido; TA: tamaño del amplificado

Extracción de ADN genómico de las cepas de *E. coli*

Procedimiento.

Con una asada de cultivo bacteriano, se inocularon 3 mL de caldo Luria-Bertani y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4 a 600 nm. Posteriormente se empaquetaron 500 µL y se añadieron 570 µL de solución 1 (ver anexo 2), se agitó en vortex por 30 segundos. Posteriormente se añadieron 30 µL de SDS (20%) y el tubo se invirtió lentamente y se volvió a agitar en vortex por 20 segundos evitando la formación de burbujas. El tubo se incubó a 80°C durante cinco minutos, se enfrió a temperatura ambiente, se agregó 2 µL de ARNasa, se incubó a 37°C durante 45 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente, se adicionó 200 µL de NaCl 5M (se agitó por inversión), se agitó durante 20 segundos en vortex y posteriormente se mantuvo 5 minutos en hielo. Se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se agregó 800 µL de isopropanol y se invirtió lentamente durante un minuto. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación. Tras el paso anterior, se adicionó 800 µL de etanol al 70%, se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm y se decantó el sobrenadante; este paso se repitió tres veces.

La pastilla obtenida se dejó secar en el horno de incubación hasta eliminar la totalidad del agua y por último se resuspendió en 80 µL de Tris (10 mM, pH 8) y se dejó incubar durante 15 minutos a 37°C.

De la suspensión obtenida, se corrieron 3 µL en un gel de agarosa al 1% para observar la calidad de la extracción.

TABLA 7. CONDICIONES DE LAS PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

PCR	Gen	Nombre del oligonucleótido	DI	Ciclos de amplificación			EF	Conservación
1	<i>elt</i>	LT-F	96°C/ 4min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95°C / 20 seg 57°C / 20 seg 72°C/ 1 min	72°C/ 7 min	4°C
		LT-R						
	<i>est</i>	ST-F						
		ST-R						
	<i>bfpa</i>	BFPA-F						
		BFPA-R						
	<i>eae</i>	EAE-F						

	aatA	EAE-R						
		CVD432-F						
	CVD432-R							
	AAIC-F							
aaiC	AAIC-R							
2	eae	EAE2-F	95°C/ 5 min	35 Ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95°C / 20 seg 55°C / 45 seg 72°C / 30 seg	72°C/ 7 min	4°C
		EAE2-R						
	ehxA	ehxA-F						
		ehxA-R						
	stx1	stx1-F						
		stx1-R						
	stx2	stx2-F						
		stx2-R						
3	daaE	daaE-F	94°C/ 2min	40 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	92°C / 30 seg 59°C / 30 seg 72°C / 30 seg	72°C/ 5 min	4°C
		daaE-R						
	ipaH	ipaH-F						
		ipaH-R						

DI: desnaturalización inicial; EF: extensión final; seg: segundos; min: minutos

Falta incluir las referencias

Amplificación de genes BLEE

Las cepas multiresistentes (resistentes a dos o más antibióticos de dos o más familias) y positivas para la producción fenotípica de BLEE fueron seleccionadas para la amplificación de genes BLEE. Para ello se utilizaron oligonucleótidos descritos en la tabla 8 y las condiciones de cada PCR se describen en la tabla 9.

TABLA 8. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE GENES BLEE EN LAS CEPAS DE *E. coli* y *Citrobacter* spp.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Gen blanco	TA (pb)	Referencia
CTX-M-Universal-F	CGATGTGCAGTACCAGTAA	<i>bla</i> _{CTX-M}	566	Batchelor, <i>et al.</i> , 2005
CTX-M-Universal-R	TTAGTGACCAGAATCAGCGG			
CTX-M13U	GGTAAAAAATCACTGCGYC	<i>bla</i> _{CTX-M} Gpo. 1	843	Briñas, <i>et al.</i> , 2005
CTX-M13D	TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
CTX-M-2-F	ATGATGACTCAGAGCATTCG	<i>bla</i> _{CTX-M} Gpo. 2	876	Bertrand <i>et al.</i> , 2006
CTX-M-2-R	TCAGAAACCGTGGGTTAC			
CTX-M-8-F	TGATGAGACATCGCGTTAAG	<i>bla</i> _{CTX-M} Gpo. 8	875	Jouini <i>et al.</i> , 2007
CTX-M-8-R	TAACCGTCGGTGACGATTTT			
CTX-M-9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	<i>bla</i> _{CTX-M} Gpo. 9	857	Coque, <i>et al.</i> , 2002
CTX-M-9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
TEM-F	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	<i>bla</i> _{TEM}	1209	Belaaouaj, <i>et</i>

TEM-R	ACGCTCAGTGGAAACGAAAAC			<i>al.</i> , 1994
SHV-F	CACTCAAGGATGTATTGTG	<i>bla</i> _{SHV}	883	Pitout <i>et al.</i> , 1998
SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTCG			
OXA-1	CCAAAGACGTGGATG	<i>bla</i> _{OXA-1}	442	Briñas, <i>et al.</i> 2005
OXA-2	GTTAAATTCCACCCCAAGTT			
CMYd-F	AATCGWTATGCTGCGCDCTGC	<i>bla</i> _{CMY}	1131	En este estudio
CMYd-R	GYAGYTTTTCAAGAATGCGCCAG			

TA: tamaño del amplificado

TABLA 9. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE GENES BLEE

Gen blanco	Nombre del oligonucleótido	Desnaturalización Inicial	Ciclos de amplificación			Extensión final	Conservación
			Ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	Temperatura/ tiempo		
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-Universal-F CTX-M-Universal-R	94°C/5min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/30seg 52°C/30seg 72°C/1min	72°C/5min	4°C
<i>bla</i> _{CTX-M Gpo. 1}	CTX-M13U CTX-M13D	94°C/7min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/50seg 50°C/40seg 68°C/1min	68°C/5min	4°C
<i>bla</i> _{CTX-M Gpo. 2}	CTX-M-2-F CTX-M-2-R	94°C/7min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/50seg 52°C/30seg 68°C/1min	72°C/5min	4°C
<i>bla</i> _{CTX-M Gpo. 8}	CTX-M-8-F CTX-M-8-R	94°C/7min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/50seg 54°C/30seg 68°C/1min	72°C/5min	4°C
<i>bla</i> _{CTX-M Gpo. 9}	CTX-M-9-F CTX-M-9-R	94°C/3min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/45seg 62°C/45seg 72°C/45seg	72°C/10min	4°C
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F TEM-R	94°C/3min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 60°C/1min 72°C/1min	72°C/5min	4°C
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F SHV-R	95°C/15seg	24 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	96°C/15seg 52°C/15seg 72°C/2min	72°C/3min	4°C
<i>bla</i> _{OXA-1}	OXA-1 OXA-2	95°C/5min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	96°C/1min 61°C/1min 72°C/2min	72°C/10min	4°C
<i>bla</i> _{CMY}	CMYd-F CMYd-R	95°C/3min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95°C/30seg 65°C/30seg 72°C/30seg	72°C/3min	4°C

Caracterización del gen *bla*_{CMY-144} en la cepa de *Citrobacter freundii* BUAP385Cf

Oligonucleótidos utilizados para secuenciar CMY

Se diseñaron los oligonucleótidos AmpRFH2-F y CMYbcl-R previamente reportados (Porres-Osante *et al.*, 2015) que se alinean en el gen *ampR* y *bcl* para obtener un fragmento de 2421 pb.

Para el entorno genético de CMY se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *sugE* (*sugE*-R) y *frdB* (*frdB*-F) de tal forma que se pudiera caminar dentro de la secuencia de 4252 pb, ver tabla 10.

TABLA 10. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ENTORNO GENÉTICO DE CMY EN LA CEPA DE *C. freundii* BUAP385Cf

Oligonucleótido	Secuencia	Gen blanco	TA (pb)	Secuenciación		Referencia
AmpRFH2-F	GTACATGCGTTAATTATCAGGC	<i>ampR</i>	2421	AmpRFH2-F	1584pb	Porres-Osante N. <i>et al.</i> , 2014
CMYbcl-R	TAAAACCAGGTTCCAGATAGC	<i>bcl</i>		CMY1-R		
CMY1-F	ACCTGGGGTAAAGCCGATA	<i>bla</i> _{CMY}	353	CMY1-F	1190pb	Ayala-Nuñez T. <i>et al.</i> , 2015
CMY1-R	CCAAACAGACCAATGCTGGAGT	<i>bla</i> _{CMY}		CMYbcl-R		
CMY1-F	ACCTGGGGTAAAGCCGATA	<i>bla</i> _{CMY}	1920	SugE-R	~1000 pb	Este trabajo
<i>sugE</i> -R	AGTTCTGGAGCCTGATATGTCC	<i>sugE</i>				
<i>frdB</i> -F	TTCATTGGACCGCTGCGATTA	<i>frdB</i>	2594	<i>frdB</i> (IS26-F	~1500 pb	Este trabajo
CMY1-R	CCAAACAGACCAATGCTGGAGT	<i>bla</i> _{CMY}				

TA: tamaño del amplificado

TABLA 11. CONDICIONES UTILIZADAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL ENTORNO GENÉTICO DE CMY

Fragmento	Nombre del oligonucleótido	Desnaturalización Inicial	Ciclos de amplificación			Extensión final	Conservación
			Ciclos	Desnaturalización	Alineamiento		
<i>ampR</i> - <i>Bla</i> _{CMY} - <i>bcl</i>	AmpRFH2-F CMYbcl-R	95°C/3min	30 ciclos	Desnaturalización	95°C/30seg	72°C/3min	4°C
				Alineamiento	56°C/30seg		
				Extensión	72°C/45seg		
<i>sugE</i> - <i>bcl</i> - <i>bla</i> _{CMY}	CMY1-F <i>sugE</i> -R-R	95°C/3min	30 ciclos	Desnaturalización	95°C/30seg	72°C/3min	4°C
				Alineamiento	65°C/30seg		
				Extensión	72°C/30seg		

<i>bla</i> _{CMY} – <i>ampR</i> – <i>frdD/C/</i> <i>B</i> –	frdB-F CMY1-R	95°C/3min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95°C/30seg 56°C/30seg 72°C/45seg	72°C/3min	4°C
--	------------------	-----------	--------------	--	--	-----------	-----

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI se define como la cantidad mínima de antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento de un determinado microorganismo tras la incubación de 24h.

En el antecedente directo de este trabajo, mediante el ensayo de difusión en disco, se observó resistencia (R) y resistencia intermedia (I) a imipenem en las cepas de *Citrobacter* spp., [BUAP454Cf (I), BUAPA7Cb (I), BUAPA8Cf (I), BUAPA9Cy (I), BUAPA10Cy (R) y BUAPA11Cf (I)] por lo que se decidió corroborar mediante CMI.

Procedimiento

Se partió de un cultivo puro de las cepas a evaluar, que se resuspendió en un tubo con 5 mL de SSI al 0.85% (masa/volumen) de NaCl para ajustar la turbidez a 0.5 de la escala de McFarland, la cual equivale a 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente se hizo una dilución 1:10 con SSI (1.5×10^7 UFC/mL) y se depositaron por duplicado 2 μ L por goteo de esta suspensión en placas con agar M-H suplementadas con imipenem, el inóculo final por lo tanto fue de 1.5×10^4 UFC/mL. Las concentraciones evaluadas de imipenem fueron: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 μ g/mL.

Una vez inoculadas las placas se esperó a que se secase el inóculo y se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Finalmente se observó el crecimiento bacteriano sobre las placas y se buscó la concentración a la cual ya no hubiera crecimiento.

Amplificación de genes que codifican para β -lactamasas con actividad carbapenemasa

Los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC} y *bla*_{GES} fueron amplificados en las cepas de *Citrobacter* spp., con fenotipo de resistencia intermedia a imipenem y otros antibióticos β -lactámicos observado en estas cepas. Los oligonucleótidos usados para la amplificación de estos genes se muestran en la tabla 12, así como las condiciones de PCR en la tabla 13.

TABLA 12. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC} y *bla*_{GES}

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Gen blanco	Tamaño del producto (pb)	Referencia
IMP-F	CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG	<i>bla</i> _{IMP}	515	Bello López <i>et al.</i> , datos no publicados.
IMP-R	GCCADGCTACDANATTTGCGTC			
KPC-F	ATGTCAGTCTATCGCCGTCT	<i>bla</i> _{KPC}	882	Akpaka <i>et al.</i> , 2009
KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCCCA			
GES-F	ATGCGCTTCATTACGCAC	<i>bla</i> _{GES}	864	Dubois <i>et al.</i> , 2002.
GES-R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG			

TABLA 13. CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS DE *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC} y *bla*_{GES}

Gen blanco	Primer	D I	Ciclos de amplificación			Extensión final	Conser vación
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F IMP-R	92°C/5 min	32 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 56°C/1min 72°C/1min	72°C/10min	4°C
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F KPC-R	94°C/5 min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 55°C/1min 72°C/1min	72°C/10min	4°C
<i>bla</i> _{GES}	GES-F GES-R	94°C/5 min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95°C/1min 55°C/1min 72°C/1min	72°C/1min	4°C

Amplificación de genes involucrados en la resistencia a quinolonas

Las cepas con un fenotipo de resistencia a una o más quinolonas por el método de Kirby-Baüer fueron candidatas a la amplificación de los genes involucrados en esta resistencia, para lo cual se utilizaron oligonucleótidos que se muestran en la tabla 14 y en la tabla 15 se muestran las condiciones usadas para la amplificación de los mismos mediante PCR.

TABLA 14. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE GENES PLASMÍDICOS Y CROMOSÓMICOS ASOCIADOS A LA RESISTENCIA A QUINOLONAS

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Gen blanco	Amplicón (pb)	Referencia
GyrA-F	TACACCGGTCAACATTGAGG	<i>gyrA</i> <i>E. coli</i>	648	Oram and Fisher, 1991
GyrA-R	TTAATGATTGCCGCCGTCGG			
GyrAci-F	AAATCTGCCCGTGTCTGTTGGT	<i>gyrA</i> <i>Citrobacter</i>	344	Vila <i>et al.</i> , 1995
GyrAci-R	GCCATACCTACGGCGATACC			
parC-F	AAACCTGTTCAGCGCCGCATT	<i>parC</i> <i>E. coli</i>	395	Vila <i>et al.</i> , 1996
ParC-R	GTGGTGCCGTTAAGCAAA			
ParCci-F	GAAACCCGTTTCAGCGTCGC	<i>parC</i> <i>Citrobacter</i>	241	Este estudio
ParCci-R	CATCGCCGCGAAGGATTTTCG			
QnrA-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	543	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
QnrA-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
QnrB-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	<i>qnrB</i>	681	Wang <i>et al.</i> , 2008
QnrB-R	TTTGCYGYCCGCGAGTCGAA			
QnrS-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS</i>	654	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
QnrS-R	CTAAACCGTCGAGTTCGGCG			
QepA-F	CGTGTGCTGGAGTTCTTC	<i>qepA</i>	403	Cattoir <i>et al.</i> , 2008
QepA-R	CTGCAGGTACTGCGTCATG			
OqxA-F	CTCGGCGCGATGATGCT	<i>oqxA</i>		Kim <i>et al.</i> , 2009
OqxA-R	CCACTCTTCACGGGAGACGA			
OqxB-F	TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC	<i>oqxB</i>		
OqxB-R	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA			
aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	<i>aac(6')-Ib</i>	438	Park <i>et al.</i> , 2006
aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGT			

TABLA 15. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A QUINOLONAS

Gen blanco	Oligonucleótido	Desnaturalización Inicial	Ciclos de amplificación			Extensión final	Conservación
			Ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	Temperatura/Tiempo		
<i>gyrA</i> <i>E. coli</i>	GyrA-F GyrA-R	92°C/3min	32 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	92°C/25seg 64°C/1min 74°C/2min	72°C/3min	4°C
<i>gyrA</i> <i>Citrobacter</i>	GyrAci-F GyrAci-R	92°C/3min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 55°C/1min 72°C/1min	72°C/3min	4°C
<i>parC</i> <i>E. coli</i>	parC-F ParC-R	94°C/3min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 55°C/1min 72°C/1min	72°C/3min	4°C

<i>parC</i>	ParCci-F ParCci-R	94°C/3min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 59°C/1min 72°C/1min	72°C/3min	4°C
<i>qnrA</i>	QnrAm-F QnrAm-R	95°C/5min	40 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95°C/1min 56°C/1min 72°C/1min	72°C/7min	4°C
<i>qnrB</i>	QnrB-F QnrB-R	95°C/5min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95°C/1min 56°C/1min 72°C/1min	72°C/7min	4°C
<i>qnrS</i>	QnrSm-F QnrSm-R	95°C/5min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95°C/1min 55°C/1min 72°C/1min	72°C/7min	4°C
<i>qepA</i>	QepA-F QepA-R	96°C/1min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	96°C/1min 60°C/1min 72°C/1min	72°C/5min	4°C
<i>oqxA</i>	OqxA-F OqxA-R	94°C/5min	34 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/45seg 61°C/45seg 68°C/1min	72°C/7min	4°C
<i>oqxB</i>	OqxB-F OqxB-R	94°C/5min	32 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/45seg 64°C/45seg 72°C/1min	72°C/7min	4°C
<i>aac(6')ib-cr</i>	aac(6')-Ib-F aac(6')-Ib-R	94°C/5min	34 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/45seg 55°C/45seg 72°C/45seg	72°C/8min	4°C

Amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos, tetraciclina y cloranfenicol

Las cepas que presentaron resistencia a los aminoglucósidos, tetraciclina y cloranfenicol por el método de Kirby-Bauer se les amplificaron algunos de los genes involucrados en la resistencia a estos antibióticos, de igual forma para la cepa de *C. freundii* BUAP385 se amplificaron los genes *qac* y *sul*, así como el gen *int1* para ver la presencia de integrones de clase 1. Para estos genes solo se observó su presencia ya que no se mandaron a secuenciar. Los oligonucleótidos y las condiciones de PCR se mencionan en la tabla 16 y tabla 17 respectivamente.

TABLA 16. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE *aac(3')-II*, *tet A/B* y *cmIA* EN LAS CEPAS DE *E. coli* y *Citrobacter* spp.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Gen blanco	Amplicón (pb)	Referencia
aac3-F	CTCGGACACAGTCTTGTA	<i>aac(3')-II</i>	237	Ruiz <i>et al.</i> , 2009
aac3-R	ATCGCTGATCTTTGACCCTG			

tetA-F	GTAATTCTGAGCACTGTCCG	<i>tetA</i>	957	Agerso <i>et al.</i> , 2005	
tetA-R	CTGCCTGGACAACATTGCTT				
tetB-F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	<i>tetB</i>	659		
tetB-R	GTAATGGGCAATAACACCG				
cmlA-F	TGTCATTTACGGCATACTCG	<i>cmlA</i>	456		Sáenz <i>et al.</i> , 2004
cmlA-R	ATCAGGCATCCCATTCCCAT				

TABLA 17. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *aac(3')-II*, *tet A/B* y *cmlA*

Gen blanco	Primer	Desnaturalización Inicial	Ciclos de amplificación			Extensión final	Conser vación
			Ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	92°C/25seg 64°C/1min 74°C/2min		
<i>aac(3')-II</i>	aac3-F aac3-R	92°C/ 3min	32 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	92°C/25seg 64°C/1min 74°C/2min	72°C/3min	4°C
<i>tetA</i>	tetA-F tetA-R	94°C/ 7min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/50seg 50°C/40seg 68°C/1min	68°C/5min	4°C
<i>tetB</i>	tetB-F tetB.R	94°C/ 3min	35 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/45seg 62°C/45seg 72°C/45seg	72°C/5min	4°C
<i>cmlA</i>	cmlA-F cmlA-R	94°C/ 5min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 55°C/1min 72°C/1min	72°C/5min	4°C

Caracterización parcial de plásmidos

En las cepas de *E. coli* y *Citrobacter* portadoras de genes de interes plamidicos, se amplificaron los genes que codifican para los grupos de incompatibilidad (Inc) por PBRT (Carattoli *et al*, 2005) y se realizó extracción de plásmidos. En las cepas de *Citrobacter* spp., seleccionadas, además de la amplificación de los grupos Inc por PBRT se les amplificó los diferentes motivos MOB (DPMT) de las relaxasas para clasificar los plásmidos por movilidad (Alvarado *et al*, 2012).

Método PBRT

Como se describió en la introducción, este método sirve para clasificar los plásmidos por su grupo de incompatibilidad (Carattoli *et al.*, 2005). Para ésta técnica se emplearon 5 PCRs múltiplex y 3 PCRs simplex para identificar 18 grupos Inc. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 19 y las condiciones en la tabla 20.

TABLA 19. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL MÉTODO PBRT

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Sitio blanco	Amplicón (pb)	Referencia
HI1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	parA-parB	471	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	iterons	644	
HI2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	RNAI	139	
I1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	ori g	376	
X RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC			
L/M FW	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	repA	785	
L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	repA	559	
N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	iterons	462	
FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
FIB FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	repA	702	
FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
W FW	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	repA	242	
W RV	GGTGCGCGCATAGAACCGT			
Y FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	repA	765	
Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			
P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	iterons	534	
P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	repA2	262	
FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT			
A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	repA	465	
A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	repA	750	
T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
FIIS FW	CTGTGCTAAGCTGATGGC	repA	270	
FIIS RV	CTCTGCCACAACTTCAGC			
FrepB FW	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	RNAI/rep A	270	
FrepB RV	GAAGATCAGTCACACCATCC			

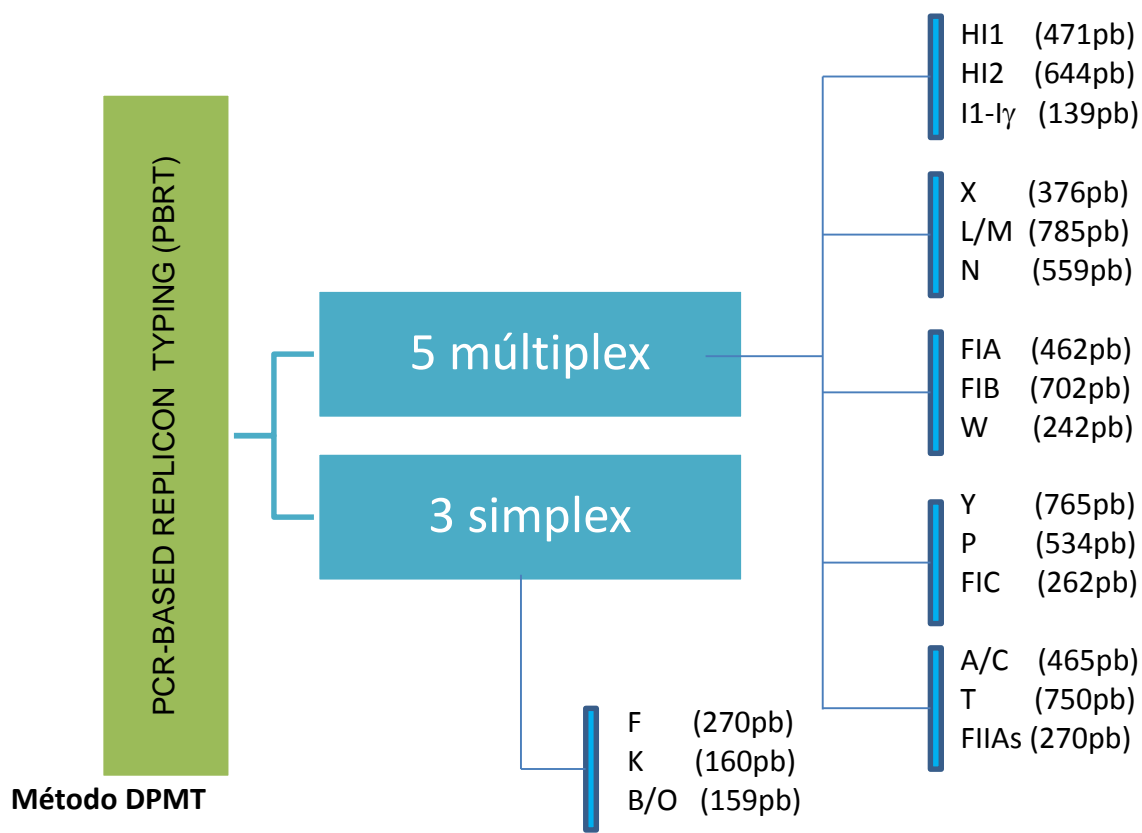
K/B FW	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	RNAI	160	
K RV	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
B/O RV	TGATCGTTTAAGGAATTTG	RNAI	159	

*Para B/O se utiliza el reverso de K.

TABLA 20. CONDICIONES DE PCR UTILIZADAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE REPLICONES POR PBRT

PCR	Desnaturalización Inicial	Ciclos de amplificación			Extensión final	Conservación
		30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 60°C/30seg 72°C/1min		
Múltiplex y simplex K y B/O	94°C/5min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 60°C/30seg 72°C/1min	72°C/5min	4°C
Simplex F	94°C/5min	30 ciclos	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C/1min 52°C/30seg 72°C/1min	72°C/5min	4°C

A continuación, se muestra el esquema para la realización de las PCRs.



En las cepas de *Citrobacter* spp., los plásmidos también fueron clasificados por el método de la relaxasa (DPMT) para lo cual se siguió la estrategia reportada previamente (Alvarado *et al.*, 2012). En la tabla 21 se describen los oligonucleótidos empleados para este método.

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes:

Una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, 25-30 ciclos (dependiendo de cada oligonucleótido). Una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, una alineación de 30 segundos a una temperatura dependiendo de cada oligonucleótido (ver tabla 22), una extensión por ciclo a 72°C por 30 segundos (en algunos casos, depende del tamaño del amplicón y se especifica en la tabla 24) y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Por último, un protocolo de PCR Touchdown fue usado para MOB H11.

TABLA 21. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS MOTIVOS MOB DE LAS RELAXASAS EN LAS CEPAS DE *Citrobacter* spp.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Sub familia MOB	Amplicón (pb)	Referencia
F11-f	GCA GCG TAT TAC TTC TCT GCT GCC GAY GAY TAY TA	F11	234	Carattoli A., et al., 2005
F1-r	ACT TTT GGG CGC GGA RAA BTG SAG RTC			
F12-f	AGC GAC GGC AAT TAT TAC ACC GAC AAG GAY AAY TAY TA	F12	234	
F1-r	ACT TTT GGG CGC GGA RAA BTG SAG RTC			
P11-f	CGT GCG AAG GGC GAC AAR ACB TAY CA	P11	180	
P1-r	AGC GAT GTG GAT GTG AAG GTT RTC NGT RTC			
P12-f	GCA CAC TAT GCA AAA GAT GAT ACT GAY CCY GTT TT	P12	189	
P1-r	AGC GAT GTG GAT GTG AAG GTT RTC NGT RTC			
P131-f	AAC CCA CGC TGC AAR GAY CCV GT	P131	180	
P1-r	AGC GAT GTG GAT GTG AAG GTT RTC NGT RTC			
P14-f	CGC AGC AAG GAC ACC ATC AAY CAY TAY RT	P14	174	
P1-r	AGC GAT GTG GAT GTG AAG GTT RTC NGT RTC			
P3-f	CC GTG AGC CAA ATC ACA CAG AAT ATK RTB TT	P31	177	
P3-r	CG AAA GCC AAC ATG AAC ATG HGG ATK HTC			
P4-f	GCG TTC AGG ATG GTC YTB TCS ATG CC	P42	163	
P4-r	C GGT TTT GAC CGT CAG ATG SVM ATG CGG			
P51-f	T ACC ACG CCC TAT GCG AAR AAR TAY AC	P51	167	
P5-r	CC CTT GTC CTG GTG YTS NAC CCA			
Q11-f	CAA TCG TCC AAG GCG AAR GCN GAY TA	Q11	331	
Q11-r	CG CTC GGA GAT CAT CAY YTG YCA YTG			
Qu-f	AGC GCC GTG CTG TCC GCB GCN TAY CG	Qu	179	
Qu-r	CTC CGC AGC CTC GRC SGC RTT CCA			
H11-f	CCG GCG TCG GAG AAY CAY CAY CA	H11	207	

H11-r	AAG GTC GTA TAC CTT YCC KGC RTC RTG			
H121-f	G CCA GCT TCC GAA TCA CAY CAY CAY CG	H121	313	
H121-r	G TCG CTT GTC GCG CCA CCG DAT RAA RTA			
H2-f	AG TTC CCA GCC TCA GAA ATC CAY CAY CAY KC	H2	264	
H2-r	G CGG ACC GTG CCA NGG RTG CCA			
C12-f	GC ACG ACT GGA AAA ATA TCG CTA TGG GGN ATH AC	C12	257	
C12-r	CAA CGT GAT AAT CCC GTC RGG VCG RTG			

TABLA 22. CONDICIONES DE PCR DEL MÉTODO DPMT

Nombre del oligonucleótido	Condiciones de PCR	Sub familia MOB	Amplicón (pb)
F11-f F1-r	25 ciclos, 53°C	F11	234
F12-f F1-r	25 ciclos, 55°C	F12	234
P11-f P1-r	25 ciclos, 60°C	P11	180
P12-f P1-r	30 ciclos, 53.8°C, 1.5 U de Taq por reacción	P12	189
P131-f P1-r	30 ciclos, 59°C, 15 segundos de extensión por ciclo	P131	180
P14-f P1-r	25 ciclos, 50°C	P14	174
P3-f P3-r	25 ciclos, 50°C	P31	177
P4-f P4-r	25 ciclos, 64°C	P42	163
P51-f P5-r	30 ciclos, 58°C, 20 segundos de extensión por ciclo	P51	167
Q11-f Q11-r	30 ciclos, 50°C	Q11	331
Qu-f Qu-r	30 ciclos, 64°C	Qu	179
H11-f H11-r	PCR Touchdown: iniciar a 65°C, Ta=-1°C por ciclo, 15 ciclos a 55°C	H11	207
H121-f H121-r	25 ciclos, 59°C	H121	313
H2-f	25 ciclos, 68°C	H2	264

H2-r			
C12-f C12-r	30 ciclos, 59°C	C12	257

Visualización de los productos de PCR

Los productos de las PCR se corrieron en geles de agarosa al 1 y 2% en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 90 Voltios durante 1 hora junto con un marcador de peso molecular O' Gene Ruler (Fermentans[®], de un rango de 100 a 3000 pb). Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) 0.5 µg/L durante 30 segundos y se lavaron en agua destilada por 1 minuto. Para visualizar los fragmentos de DNA, los geles se revelaron en un digitalizador de imágenes MiniBis Pro.

Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR que amplificaron los genes esperados, se purificaron a partir del gel de agarosa con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de los genes amplificados

Algunos de los genes amplificados se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo las indicaciones del mismo.

Análisis de las secuencias

Las secuencias recibidas se visualizaron en el programa Finch TV versión 1.4.0 Geospiza (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) y se analizaron con ayuda de herramientas informáticas en la web (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>), BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information Site (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), donde se compararon con las incluidas en la base de datos del GenBank. Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y la traducción aminoacídica se realizó en <http://molbiol-tools.ca/>. La construcción de árboles filogenéticos se realizó con el software MEGA6.

Extracción plasmídica

Método de extracción con kit

En éste método se utilizó el QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Electroforesis en campos pulsados

La electroforesis en campos pulsados es un técnica que nos permite la tipificación de cepas bacterianas mediante la relación clonal que existe entre un determinado grupo microbiano; sin embargo, en los últimos años también se ha implementado para la visualización de plásmidos, además para la determinación del número y tamaño de los mismos mediante la utilización de la enzima S1 la cual linealiza los plásmidos (Técnica modificada descrita por Barton y colaboradores en 1995).

Procedimiento

Determinación del peso molecular mediante Electroforesis en campos pulsados-S1 (PFGE-S1)

Para la determinación del peso molecular de los plásmidos de la cepa BUAP385, se usó la nucleasa S1 y la cepa *E. coli* NCTC50192 con plásmidos de peso molecular conocido como control.

Preparación de insertos: A partir de un cultivo puro de 16 horas en placa de agar BHI, se cosecharon las células y se colocaron en 1 ml de buffer TE (10mM Tris-HCl pH=8, 1mM EDTA pH=8) en un tubo eppendorf hasta que alcanzó la escala 4 de McFarland, por otro lado se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) al 1.5% en buffer TE, después se mezclaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa y se distribuyeron en los moldes; se dejaron gelificar 10 minutos en el refrigerador.

Lisis bacteriana: Se preparó la solución para la lisis 1 (Proteinasa K 0.1 mg/ml, Sarcosil 1%, Buffer TE 50 mM: 50 mM) y se pusieron 2 insertos en 1 mL de la solución de lisis y se dejaron incubando durante 18 horas a 54°C.

Lavado de insertos: Se eliminó el Buffer de lisis y se realizaron los siguientes lavados: 1) 10 ml de agua destilada durante 10 minutos en un baño de agua a 54 °C; 2) 10 ml de buffer TE 1X durante 10 minutos en un baño de agua a 54°C tres veces. Después del último lavado, se colocó 1 ml de buffer TE 1X en un tubo eppendorf estéril y ahí se colocaron los insertos.

Digestión enzimática: Se usó un cuarto, un medio y tres cuartos de inserto de cada cepa en estudio y se preparó la mezcla para la digestión (Nucleasa S1 160 U/μl; Buffer 5X; Agua tridestilada estéril). El inserto se depositó en 100 μl de la reacción de digestión y se incubó durante 40 minutos a 37°C. Tras los 40 minutos, se paró la reacción con 150 μl de EDTA 0.5M con sarcosil 1% y se dejó incubando en hielo durante 10 minutos.

Se preparó el gel de agarosa (Chromosomal Grade Agarose) al 1.2% con TBE 0.5X y ya que gelificó se rellenaron los pocillos con los insertos para posteriormente sellarse con agarosa.

Electroforesis: Se usó Buffer TBE 0.5X suplementado con tiourea 75 μM como Buffer de corrimiento y las siguientes condiciones: Gradiente 6 V/cm, rampa lineal pulsada de 1-30 segundos, 20 horas, 14°C. Por último, el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (0.5 μg/L) y se visualizó en el fotodocumentador MiniBis Pro.

RESULTADOS

Objetivo 1. Aislar e identificar cepas de *Citrobacter* spp. y *E. coli*, a partir de muestras de leche, carne, verduras crudas y clínicas.

Se analizaron un total de 438 muestras, de las cuales 286 fueron de leche cruda de vaca, 50 de vegetales (cilantro), 93 de carne cruda de pollo (alón), 4 de portadores humanos (coprocultivo) y 5 muestras clínicas pediátricas (tabla 23). Las muestras y los aislamientos

fueron recuperados en diferentes periodos de tiempo como se muestra en la tabla 25 y el número de cepas aisladas fue de 30 (*E. coli*: n=16, *Citrobacter* spp.: n=14).

Todas las cepas fueron recuperadas de la siembra en medio Levine suplementado con cefotaxima (2µg/mL) a excepción de las cepas de portadores y las clínicas. Posteriormente se identificaron. 30 cepas fueron confirmadas mediante pruebas bioquímicas clásicas para su identificación mencionada en material y métodos de acuerdo al procedimiento del anexo 1.

Las 5 cepas de origen clínico (lesión tumoral y líquido pleural) donadas por el Hospital para el Niño Poblano estaban confirmadas en género y especie por el sistema semiautomatizado VITEK 2, sin embargo, también se les realizó las correspondientes pruebas bioquímicas.

TABLA 23. MUESTRAS BIOLÓGICAS Y CEPAS RECUPERADAS.

Muestra	No. de muestras	Fecha de muestreo	Bacteria	Cepas recuperadas
Leche cruda	286	Sep-Nov/2015	<i>Escherichia coli</i>	16
Vegetales	50	Jul-Dic/ 2014	<i>Citrobacter freundii</i>	1
Carne de pollo*	93	Feb-Jun/2009	<i>Citrobacter freundii</i>	4
Portadores*	4	Feb-Jun/2009	<i>Citrobacter freundii</i>	4
Clínicas	5	Jul-Dic/2014	<i>Citrobacter spp.</i>	5
Total	438			30

*Romero-Romero, S y Rocha Gracia, 2010. Tesis de Licenciatura en Biomedicina.

Cepas bacterianas de *Citrobacter* spp.

En el caso de las cepas de *Citrobacter* spp. se emplearon cepas clínicas y de portadores humanos debido a la baja prevalencia de este microorganismo en las muestras de alimento empleadas para este trabajo; además, datos interesantes observados en un trabajo previo con estas cepas permitieron continuar con este estudio. Los datos específicos, así como cada una de la especie bacteriana del género *Citrobacter* se muestran en la tabla 24.

TABLA 24. ORIGEN DE AISLAMIENTO Y ESPECIES DE LAS CEPAS DE *Citrobacter spp.*

Cepa	Origen	Muestra	Bacteria	Portador/ Paciente	Edad (años)	Sexo
BUAP362Cf	Pollo	Alas de pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----
BUAP385Cf	Pollo	Alas de pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----
BUAP395Cf	Pollo	Alas de pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----
BUAP400Cf	Pollo	Alas de pollo	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----
BUAPA6Cf	Cilantro	Hojas	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----
BUAP453Cf	Portador	Coprocultivo	<i>C. freundii</i>	1	-----	F
BUAP454Cf	Portador	Coprocultivo	<i>C. freundii</i>	2	22	M
BUAP458Cf	Portador	Coprocultivo	<i>C. freundii</i>	3	-----	F
BUAP460Cf	Portador	Coprocultivo	<i>C. freundii</i>	4	-----	F
BUAPA6Cf	Cilantro	Hojas	<i>C. freundii</i>	-----	-----	-----
BUAPA7Cb	HNP	Líquido peritoneal	<i>C. brakii</i>	5	10.6	M
BUAPA8Cf	HNP	Líquido peritoneal	<i>C. freundii</i>	6	13.5	M
BUAPA9Cy	HNP	Lesión tumoral antebrazo I.	<i>C. youngoe</i>	7	9.4	M
BUAPA10Cy	HNP	Lesión tumoral Antebrazo I.	<i>C. youngoe</i>	7	9.4	M
BUAPA11Cf	HNP	Líquido peritoneal	<i>C. freundii</i>	8	16.9	F

HNP: Hospital para el Niño Poblano.

Cepas bacterianas de *E. coli*

El origen y la nomenclatura de las cepas de *E. coli* aisladas de muestras de leche cruda de vaca se muestran en la tabla 25.

TABLA 25. ORIGEN DE AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE *E. coli*

Origen	Clave	Bacteria
Leche de vaca	BUAP94Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP102Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP103Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP104Ec	<i>E. coli</i>

Leche de vaca	BUAP107Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP130Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP140Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP180Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP182Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP183Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP194Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP209Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP267Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP268Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP280Ec	<i>E. coli</i>
Leche de vaca	BUAP281Ec	<i>E. coli</i>

Adicional a la identificación bioquímica, se realizó la amplificación del gen *uidA* que codifica para la enzima β -glucoronidasa la cual es usada como marcador molecular para la identificación de *E. coli* (Martins *et al.*, 1993; Porres-Osante *et al.*, 2015). En la figura 10 se muestra el amplificado del gen *uidA* confirmando las cepas de *E. coli*.

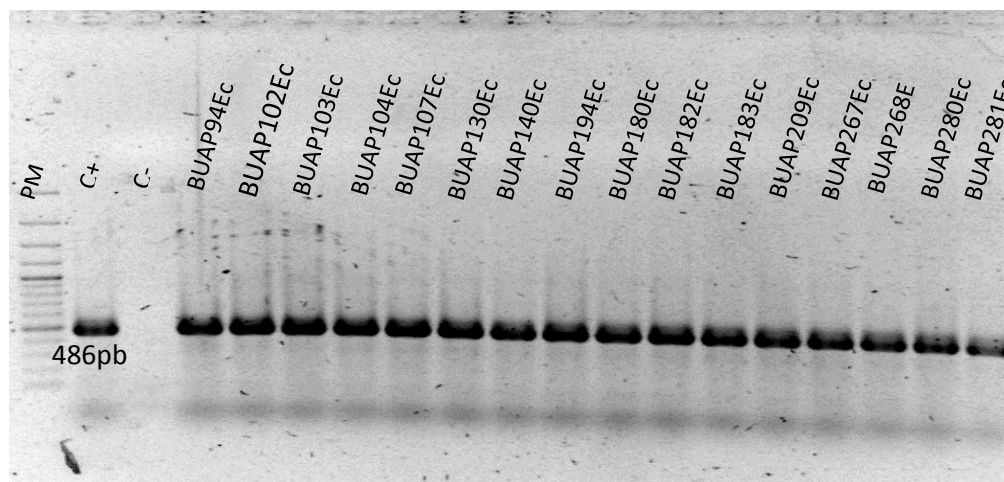


Figura 10. Amplificación del gen *uidA* para la identificación de cepas de *E. coli*.

Objetivo 2. Determinar el perfil de susceptibilidad a antibacterianos y caracterizar fenotípicamente la producción de BLEE.

***Citrobacter* spp.**

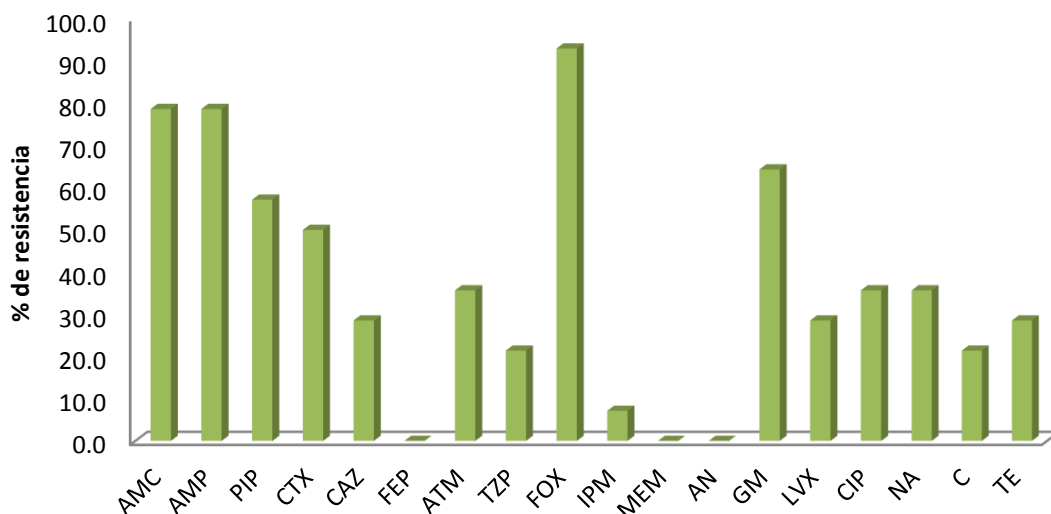
De las 14 cepas de *Citrobacter* analizadas, el 78.6% (11/14) fue resistente a amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y ampicilina (AMP), 57.1% a piperacilina (PIP), 50% (7/14) y 28.6%(4/14) a las cefalosporinas de 3ra generación cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ), respectivamente y no se observó resistencia a cefepima (FEP).

Se observó también un 35.7%(5/14) de resistencia al monobactam aztreonam (ATM) y en menor medida (21.4%) a la combinación de piperacilina/tazobactam (TZP). Se debe resaltar la resistencia a la cefalosporina de segunda generación cefoxitina (FOX) en un 92%(13/14) en casi todos los aislados ya que esta resistencia observada nos estaría hablando de la posible presencia de una cefamicinasa o una sobreexpresión de AmpC.

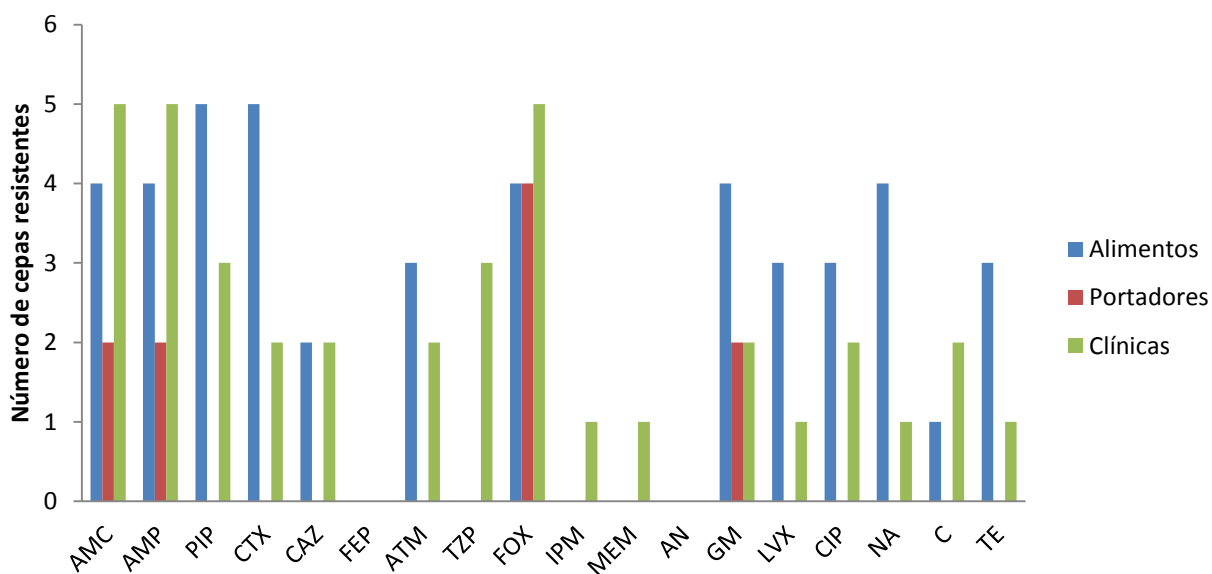
Por el método de Kirby-Baüer se observó la resistencia a imipenem (IPM) en una cepa (7.1%; BUAPA10Cy) y la resistencia intermedia a IPM en cuatro cepas más. Este fenotipo fue confirmado más tarde por CMI y por otro lado, no se observó resistencia a meropenem (MEM).

El 64% (9/14) de las cepas fue resistente al aminoglucósido gentamicina (GM) y no se observó resistencia a amikacina (AN). Para el caso de las quinolonas, se observó una resistencia del 28.6% (4/14) a levofloxacino (LVX) y 35.7% (5/14) para ciprofloxacino (CIP) y ácido nalidíxico (NA). Por último, se observó una resistencia del 21.4% (3/14) y 28.6% (4/14) para los antibióticos cloranfenicol (C) y tetraciclina (T), respectivamente. Los datos anteriores se muestran en la gráfica 1.

En la gráfica 2 se hace una comparación de las cepas resistentes de *Citrobacter* spp., de los tres tipos de cepas (alimentos, portadores y clínicas) donde se aprecia que las cepas clínicas hay una mayor multiresistencia y en segundo lugar las cepas de alimentos y en menor medida las cepas de portadores donde solo se observó resistencia a AMC, AMP, FOX y GM.



Gráfica 1. **Perfil de resistencia en la cepas de *Citrobacter* spp.** AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: ampicilina; PIP: piperacilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; TZP: trimetoprim/sulfametoxazol; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; MEM: meropenem; AN: amikacina; GM: gentamicina; LVX: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; NA: ácido nalidíxico; C: cloranfenicol; TE: tetraciclina



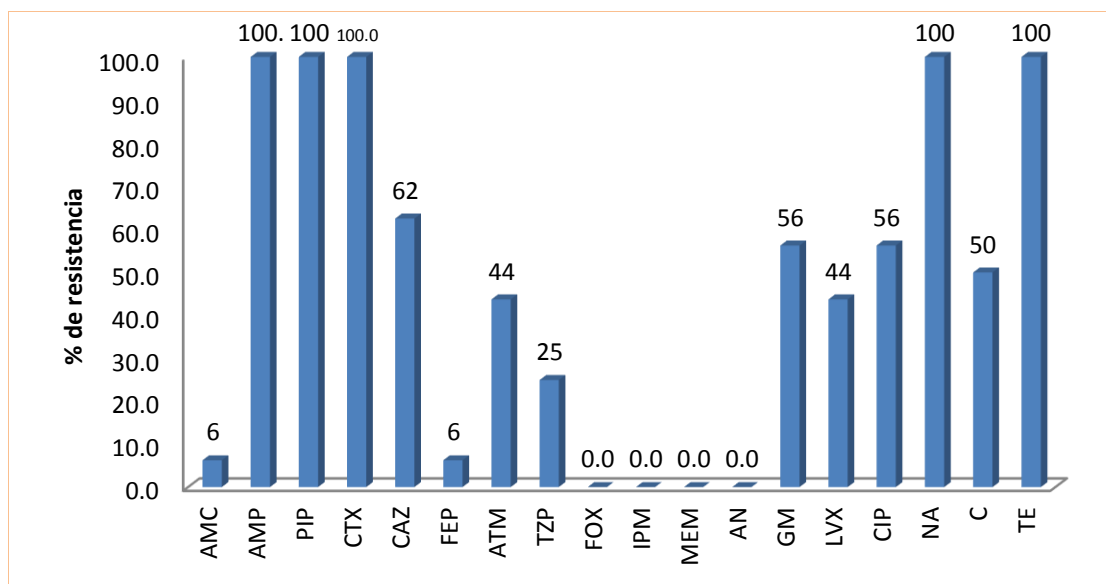
Grafica 2. **Perfil de resistencia en las cepas de *Citrobacter* spp., aisladas de muestras de alimentos, potadores y clínicas.** AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: ampicilina; PIP: piperacilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; TZP: trimetoprim/sulfametoxazol; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; MEM: meropenem; AN:

amikacina; GM: gentamicina; LVX: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; NA: ácido nalidíxico; C: cloranfenicol; TE: tetraciclina

E. coli

El 6.3% (1/16) de las cepas de *E. coli* fue resistente a amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), 100% ampicilina (AMP), piperacilina (PIP) y por el criterio de selección a la cefalosporina de 3ra generación cefotaxima (CTX), en un 62.5% (10/16) a la cefalosporina ceftazidima (CAZ) y una cepa fue resistente a cefepime (FEP). Se observó también un 43.8% (7/16) de resistencia a aztreonam (ATM) y 25% (4/16) a la combinación de piperacilina/tazobactam (TZP), y no se observó resistencia a los β-lactámicos cefoxitina (FOX), imipenem (IPM) y meropenem (MEM).

El 56.3% (9/16) de las cepas fue resistente al aminoglucósido gentamicina (GM) y no se observó resistencia a amikacina (AN). Para el caso de las quinolonas, se observó una resistencia del 43.8% (7/16) a levofloxacino (LVX), 56.3% (9/16) para ciprofloxacino (CIP) y 100% a ácido nalidíxico (NA). Por último, se observó una resistencia del 50% (8/16) para cloranfenicol (C) y 100% de las cepas fue resistente a tetraciclina (T). Los datos anteriores se muestran en la gráfica 3.



Gráfica 3. Perfil de susceptibilidad en la cepas de *E. coli*. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; AMP: ampicilina; PIP: piperacilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; TZP: trimetoprim/sulfametoxazol; FOX: cefoxitina; IPM:

imipenem; MEM: meropenem; AN: amikacina; GM: gentamicina; LVX: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; NA: ácido nalidíxico; C: cloranfenicol; TE: tetraciclina

Caracterización fenotípica de BLEE

Fenotipo BLEE en aislados de *Citrobacter* spp.

La producción fenotípica de BLEE en las cepas de *Citrobacter* spp., se realizó mediante la prueba del ácido borónico como se describió en la metodología (figura 11). En la tabla 26 se muestran los resultados del aumento de los halos de inhibición y la diferencia entre ambos, recordando que una diferencia mayor o igual a 5mm entre los discos CTX/CLA y CTXM (ambos con ácido fenilborónico) se considera una prueba positiva. Se usó como control la cepa BUAP94Ec resistente a CTX y como control negativo las cepas BUAP460Cf sensible a CTX.

Se encontró un 35.7% (5/14) de producción fenotípica de BLEE en las 14 cepas de *Citrobacter* spp.

TALA 26. FENOTIPO BLEE EN LAS CEPAS DE *Citrobacter* spp

Cepa	Halo de inhibición (mm)		Diferencia	Fenotipo BLEE
	CTX/CLA	CTX		
BUAP362Cf	20	25	-5	-
BUAP385Cf	25	22	3	-
BUAP395Cf	23	21	2	-
BUAP400Cf	30	25	5	+
BUAP453Cf	31	28	3	-
BUAP454Cf	30	28	2	-
BUAP458Cf	30	25	5	+
BUAP460Cf	30	27	3	-
BUAPA6Cf	17	16	1	-
BUAPA7Cb	24	19	5	+
BUAPA8Cf	24	19	5	+
BUAPA9Cy	30	25	5	+
BUAPA10Cy	30	28	2	-
BUAPA11Cf	30	29	1	-

*CTX/CLA: cefotaxima/ácido clavulánico/ácido fenilborónico; - negativo, + positivo.

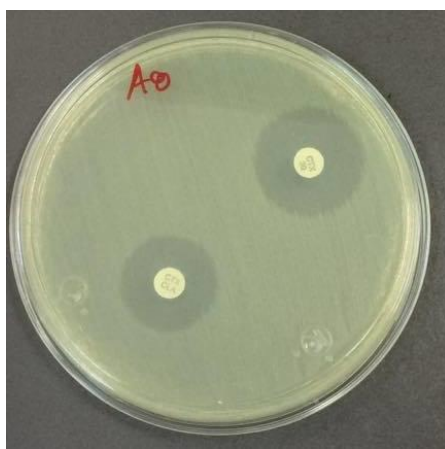
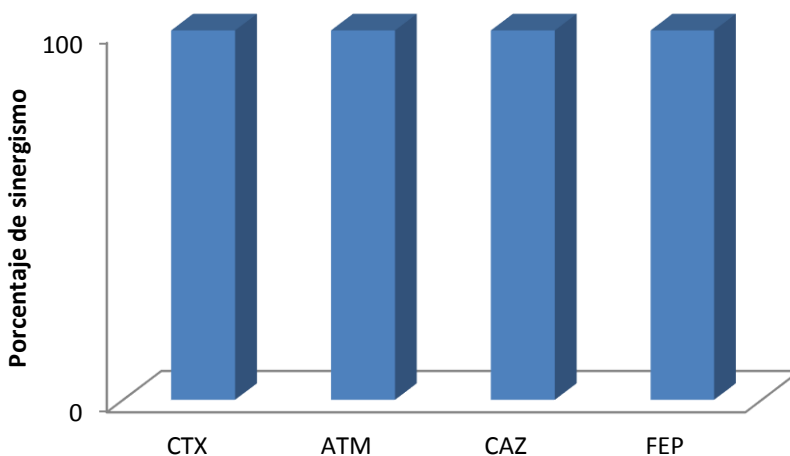


Figura 11. Prueba positiva del ácido fenilborónico para evaluar la producción fenotípica de BLEE en bacterias productoras de AmpC inducible.

Fenotipo BLEE en aislados de *E. coli*

En las cepas de *E. coli*, la caracterización de la producción fenotípica de BLEE se realizó mediante la prueba de difusión con doble disco (figura 12), como se describió en material y métodos.

De las 16 cepas, el 100% presentó sinergismo a los antibióticos CTX, ATM, CAZ y FEP como se muestra en la gráfica 5.



Gráfica 5. Porcentaje de sinergismo a los antibióticos en la prueba de difusión con doble disco. CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime.



Figura 12. Prueba de sinergismo por el método de difusión con doble disco para evaluar la producción fenotípica de BLEE en *E. coli*.

Objetivo 3. Determinar el patotipo diarreagénico y realizar la clasificación filogenética de *E. coli*.

Determinación del patotipo en las cepas de *E. coli*

Los aislados de *E. coli* fueron sometidas al análisis de la presencia de determinantes de virulencia para la identificación de la presencia de algún patotipo de *E. coli* diarreagénico (EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, EIEC y DAEC). De las 16 cepas, 15 no amplificaron ningún gen y solo la cepa BUAP94 amplificó el gen *eae* que codifica para la proteína intimina la cual está presente en la isla de patogenicidad LEE (*locus of enterocyte effacement*); sin embargo, no amplificó el gen *bfpA* que codifica para el pili formador de mechones, el cual está codificado en un plásmido. La ausencia de este plásmido en la cepa BUAP94Ec la cataloga como una *E. coli* enteropatógena atípica (EPECa) debido a la presencia del gen *eae* pero no del gen *bfpA* y la ausencia de los marcadores para EHEC. En la figura 22 se muestra la amplificación de los genes de dicha cepa en presencia de los respectivos controles.

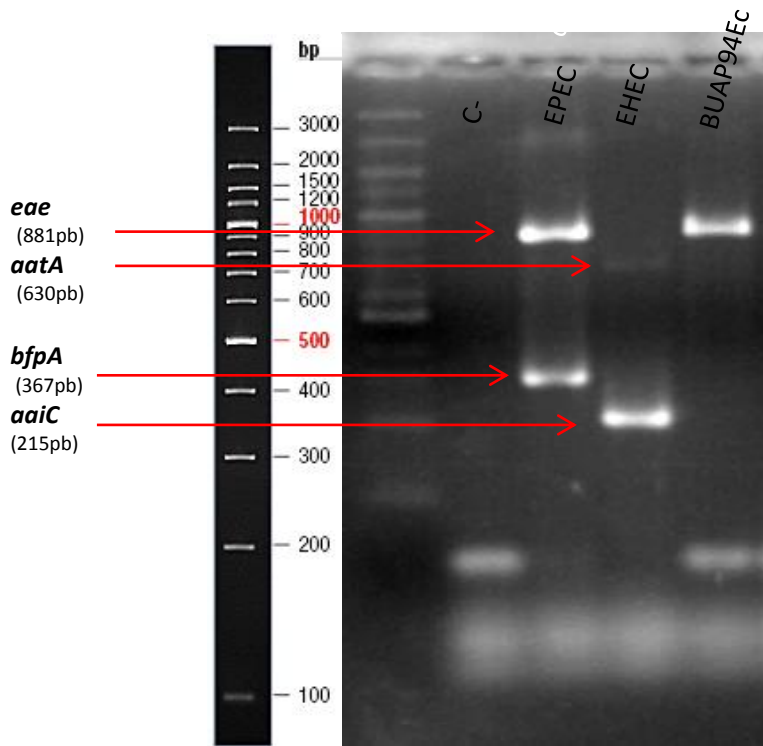
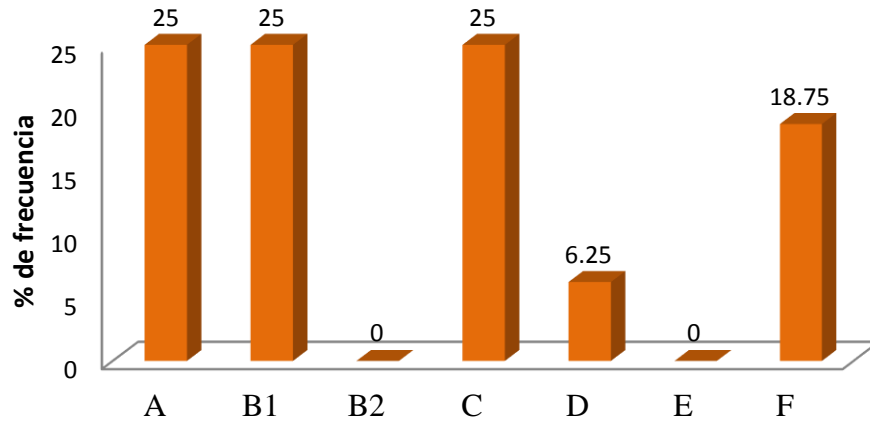


Figura 13. Amplificación de los genes *eae* y *bfpA* (EPEC) y *aatA* y *aaiC* (EHEC) en la cepa BUAP94Ec. C-: control negativo.

Clasificación filogenética de *E. coli*

El 25% (4/16) de las cepas pertenece al grupo filogenético A, 25% (4/16) pertenecen al grupo filogenético B, 25% (4/16) pertenecen al grupo filogenético C, 6.25% (1/16) pertenecen al grupo filogenético D, 18.75% (3/16) pertenecen al grupo filogenético F y ninguna de las 16 cepas pertenece al grupo filogenético B2. En la gráfica 6 se observa el porcentaje de frecuencia de cada uno de los grupos filogenéticos identificados en las cepas de *E. coli*.

En la figura 14, se observa la amplificación de los marcadores genéticos para la clasificación filogenética y en la tabla 27 se muestran los resultados obtenidos y en la figura 24, se muestran los resultados de las PCRs con los primers específicos para el filogrupo C (figura 17, A) y el filogrupo E (figura 17, B).



Gráfica 6. **Frecuencia de grupos filogenéticos en las cepas de *E. coli*.** Las 16 cepas de *E. coli* fueron analizadas para la determinación del filigrupo. 25 % de las cepas corresponden al filigrupo A, 25% al filigrupo B1, 25% al filigrupo C, 6.25% al filigrupo D y 18.75% al filigrupo F.

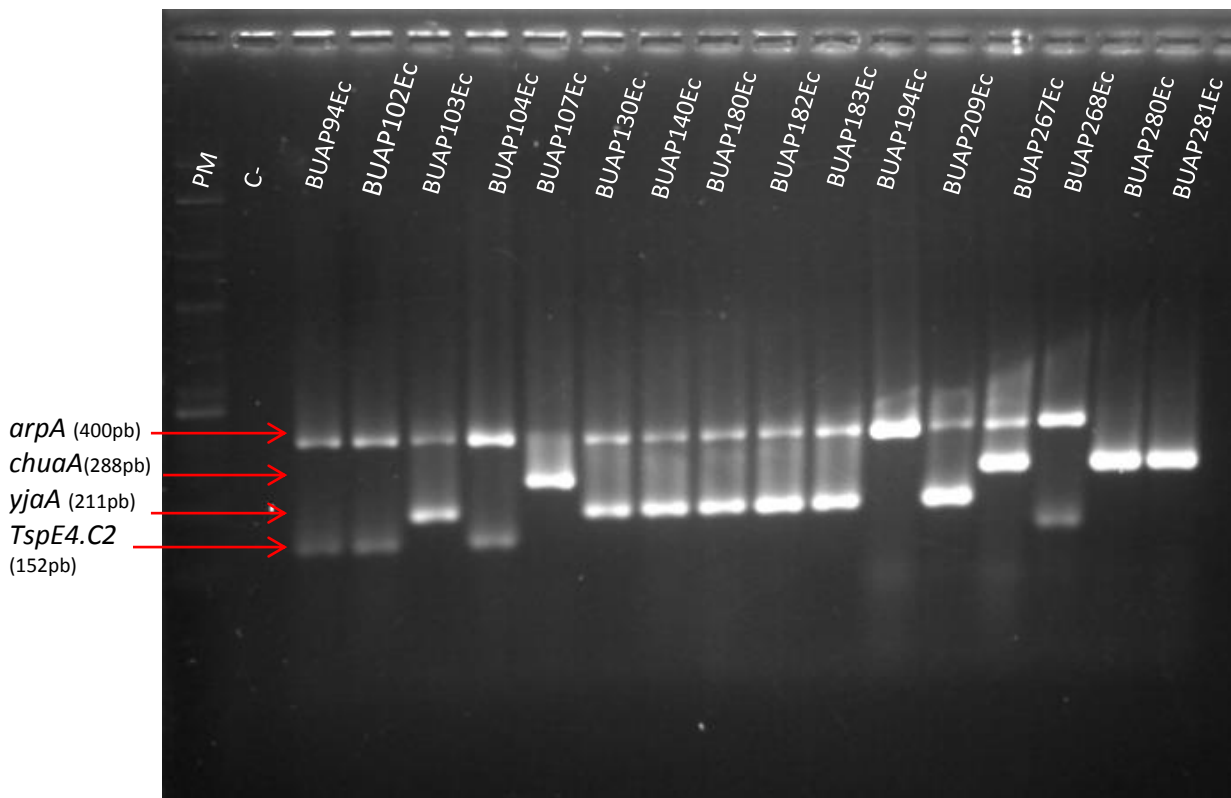


Figura 14. **Productos de PCR cuádruplex (*arpA*, *chuaA*, *yjaA*, TsPE4.C2) para la clasificación filogenética de las cepas de *E. coli*.**

TABLA 27. DETERMINACIÓN DE FILOGRUPOS

Cepa	PCR cuádruplex				Resultado cuádruplex	PCR	Confirmación PCR simplex (A o C, D o E)
	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TsPE4.C2			
BUAP94Ec	+	-	-	+	B1		
BUAP102Ec	+	-	-	+	B1		
BUAP103Ec	+	-	+	-	A o C	C	
BUAP104Ec	+	-	-	+	B1		
BUAP107Ec	-	+	-	-	F		
BUAP130Ec	+	-	+	-	A o C	C	
BUAP140Ec	+	-	+	-	A o C	C	
BUAP180Ec	+	-	+	-	A o C	A	
BUAP182Ec	+	-	+	-	A o C	A	
BUAP183Ec	+	-	+	-	A o C	A	
BUAP194Ec	+	-	-	-	A		
BUAP209Ec	+	-	+	-	A o C	C	
BUAP267Ec	+	+	-	-	D o E	D	
BUAP268Ec	+	-	-	+	B1		
BUAP280Ec	-	+	-	-	F		
BUAP281Ec	-	+	-	-	F		

+ Positivo a la amplificación, - negativo a la amplificación.

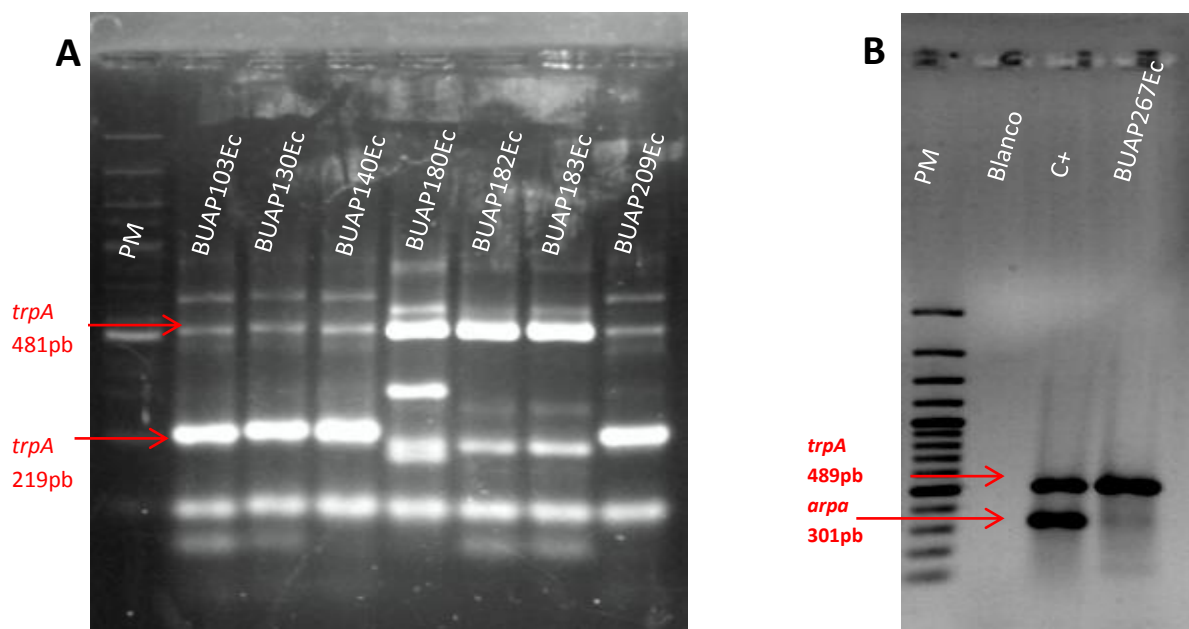
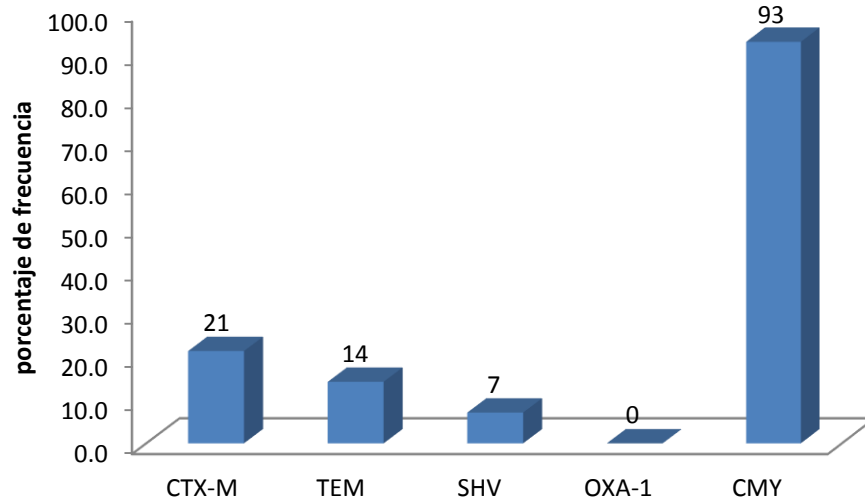


Figura 15. Electroforesis de la amplificación con los oligonucleótidos específicos para el filigrupo C (figura A, izquierda) y oligonucleótidos esoecíficos para el filigrupo E (figura B, derecha). Con esta PCR se confirma si es A o C y D o E.

Objetivo 4. Identificar genes que codifican para las BLEE y β -lactamasas tipo AmpC

Amplificación de genes BLEE en las cepas de *Citrobacter* spp.

En la gráfica 7, se muestra que el 21.4% (3/14) amplificó el gen bla_{CTX-M} , el 14% (2/14) amplificó el gen bla_{TEM} , el 7.1% (1/14) amplificó el gen bla_{SHV} y el 92.9% (13/14) amplificó el gen bla_{CMY} . No se obtuvo amplificación para el gen bla_{OXA-1} .



Gráfica 7. Porcentaje de amplificación mediante PCR de las β -lactamasas CTX-M, TEM, SHV, OXA y CMY.

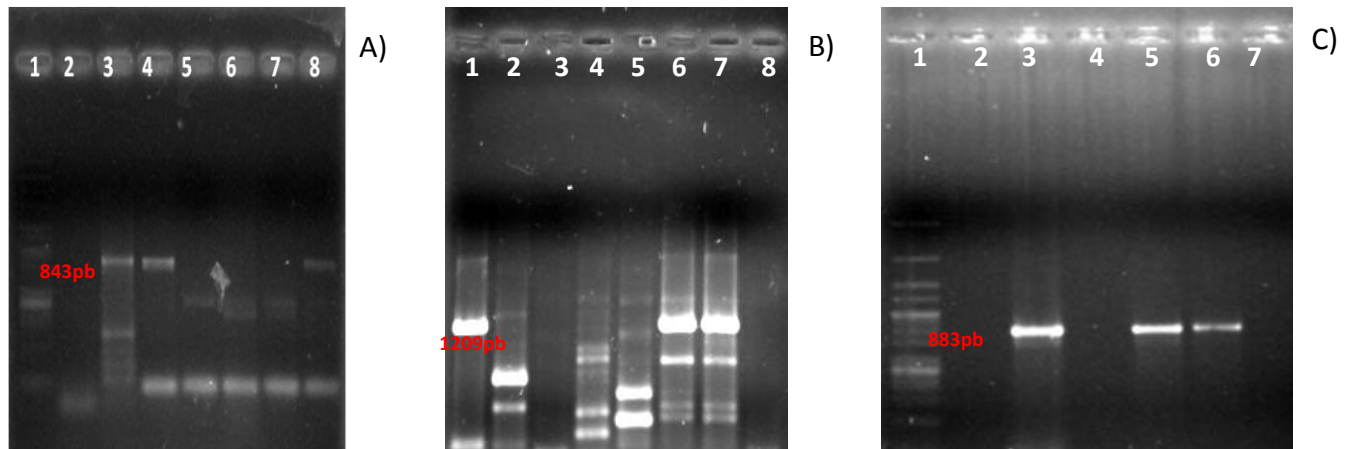


Figura 16. Amplificación de CTX-M, TEM y SHV en las cepas de *Citrobacter* spp. A) Amplificación del gen $bla_{CTX-M-1}$. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo (cepa 1550), carriles 4-8: cepas BUAPA6Cf, BUAP400Cf, BUAP362Cf, BUAP385Cf y BUAP395Cf. B) Amplificación del gen bla_{TEM} : carril 1: control positivo (cepa 560), carril 2-8): cepas BUAPA6Cf, BUAP400Cf, BUAP362Cf, BUAP385Cf y BUAP395Cf. C) Amplificación del gen bla_{SHV} : carril 1: control positivo (cepa 560), carril 2-7): cepas BUAPA6Cf, BUAP400Cf, BUAP362Cf, BUAP385Cf y BUAP395Cf.

BUAPA7Cb, BUAPA6Cf, BUAPA8Cf, BUAP400cf, BUAP385Cf, BUAP362Cf y control negativo. C) Amplificación del gen *bla_{SHV}*: carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo (cepa 560), carriles 4-7: cepas BUAPA6Cf, BUAP362Cf, BUAP385Cf y BUAP395Cf.

Una vez amplificados los genes, se purificaron y se mandaron a secuenciar siguiendo lo descrito en la metodología. Las secuencias obtenidas de los genes secuenciados se analizaron y se compararon con las reportadas en el GenBank. Las variantes de los genes que codifican para CTX-M, TEM y SHV de las cepas que amplificaron se muestran en la tabla 28.

TABLA 28. VARIANTES DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA BLEE EN LAS CEPAS DE *Citrobacter* spp.

Cepa	Fenotipo BLEE	Genotipo BLEE		
		CTX-M	TEM	SHV
BUAP362Cf	-	NA	TEM-1	SHV-12
BUAP385Cf	-	NA	TEM-1	NA
BUAP395Cf	-	CTX-M-1	NA	NA
BUAP400Cf	+	CTX-M: ND	NA	NA
BUAPA6Cf	-	CTX-M12	NA	NA

-: Negativo; +:positivo; ND: no determinado; NA: no amplificó

Para el caso del gen *bla_{CMY}*, se amplificó el fragmento *ampR-bla_{CMY}-blc* (2421pb) en las 13 cepas de *Citrobacter* que amplificaron *bla_{CMY}*. Solo se observó la amplificación en 6 cepas (BUAP385Cf, BUAP400Cf, BUAP453Cf, BUAP454Cf, BUAP458Cf y BUAPA10Cy) como se muestra en la figura 17.

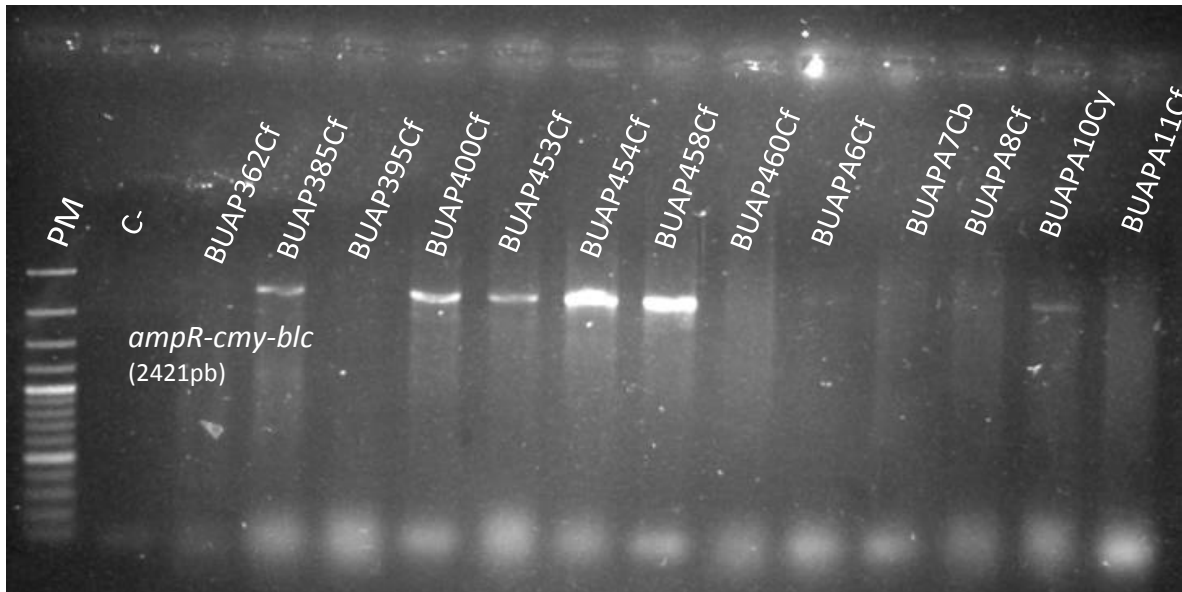


Figura 17. Electroforesis de la amplificación del fragmento *ampR-bla_{C_{MY}}-blc* en las cepas de *Citrobacter* spp.

Caracterización molecular de *bla_{C_{MY}}* en la cepa BUAP385Cf

La cepa de *C. freundii* BUAP385Cf fue seleccionada por su fenotipo y genotipo de resistencia para caracterizar el gen *bla_{C_{MY}}* para identificar el alelo y la presencia del elemento genético móvil IS26.

Amplificación y secuenciación del 16S ADNr de la cepa BUAP385Cf

Para confirmar el género del aislado BUAP385Cf, además de las pruebas bioquímicas, se realizó la amplificación y secuenciación del 16S ADNr con el cual se corroboró el género y se construyó un árbol filogenético con el software MEGA 6.0 el cual se muestra en la figura 18.

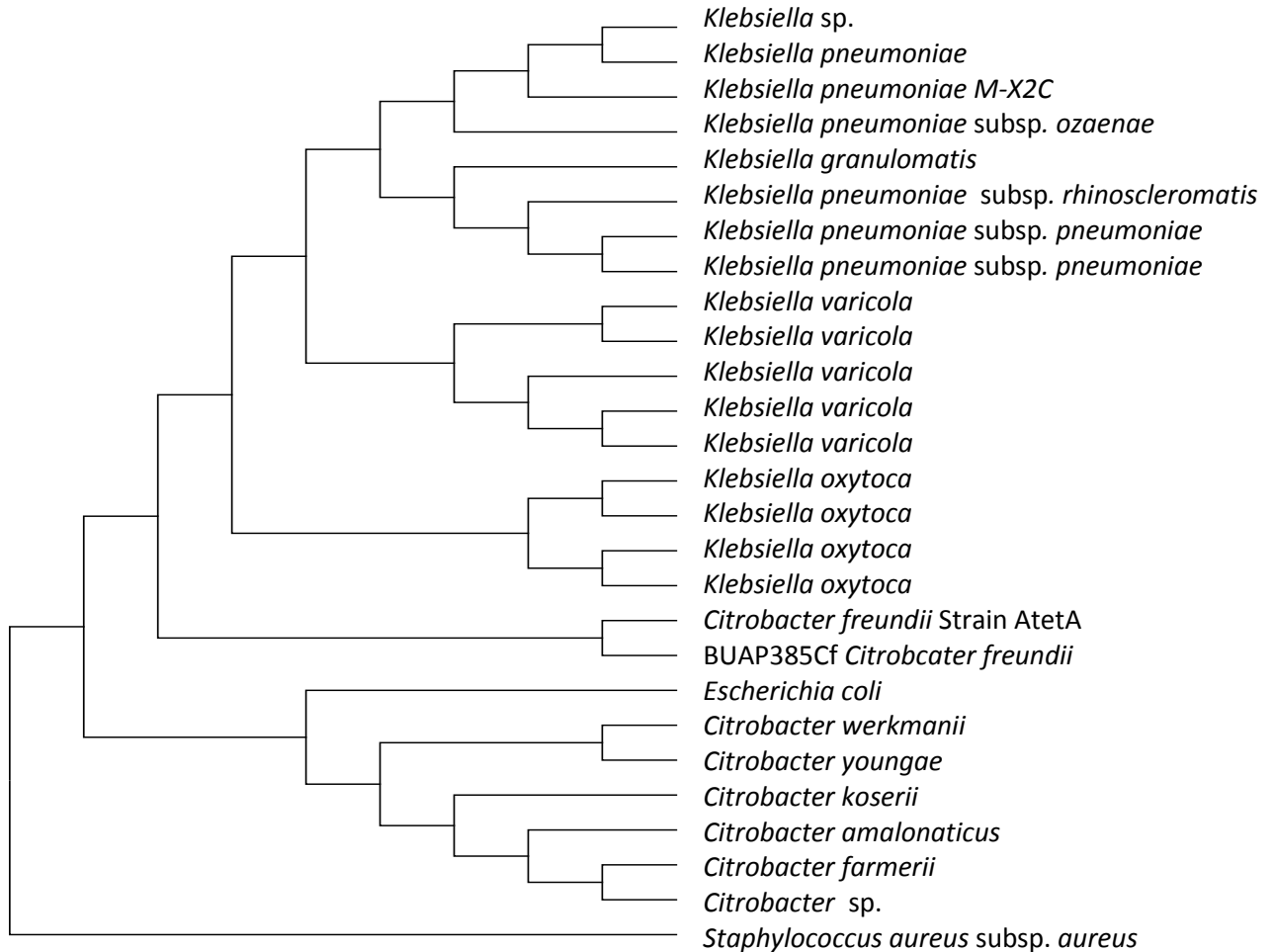


Figura 18. Arbol filogenético *neighbor-Joining* (NJ) basados en secuencias de 674pb del gen 16S ARNr de la cepa de *C. freundii* BUAP385Cf. Se usó secuencias reportadas en el GenBank de *Klebsiella*, *E. coli*, *Citrobacter* spp., y se uso la cepa de *S. aureus* como raíz del árbol ya que se encuentra filogenéticamente alejado del género *Citrobacter*. MEGA6. (KJ803930.1, KJ803930., CP010361.1, AB626120.1, HG933294.1, KM019906.1, HG933294.1, NR_025635.1, HF678365.1, JF772070.1, AB682268.1, CP009872.1, CP009208.1, CP009775.1, EU333881.1, NR_041750.1, CP009361.1, CP016762.1, JUKU00000000.1, NZ_CP014015.1, NZ_JTAV01000001.1, HG738867.1, FO203501.1, LK022719.1, LK022720.1, NZ_KQ088036.1, NC_018106.1, NZ_KQ088007.1)

El gen *bla_{CMY}* se purificó y se mandó a secuenciar. Tras la obtención de la secuencia de nucleótidos, se realizó la traducción a aminoácidos obteniendo la siguiente secuencia:

MMKKSLLCALLLTV¹SFSTFAAAKTEQQIADIVNRTITPLMQEQAI²PGMAVAVIYQGKPY³YF
 TWGKADIANNHPVTQQT⁴LFELGSVSKTFNGVLGGDAIARGEIN⁵LSDPVTKYWPELTGKQWQ
 GISLLHLATYTAGGLPLQIPDDVTDKAALLRFYQNWQPQWAPGAKRLYANSSIGLFGALAV

KPSGMSYEEA **I**TRRVLQPLKLAHTWITVPQSEQKDYAWGYREGKPVHVSPGQLDAEAYGVK
 SNVTDMARWVQVNMDASRVQEKTLQQGIALAQSRYWRIGDMYQGLGWEMLNWPLKADSIIN
 GSDSKVALAALPAVEVNPPAPAVKASWVHKTGSTGGFGSYVAF **I**PEKNLGIVMLANKSYPN
 PVRVEAAWRILEKLQ

Se identificaron 4 cambios aminoácídicos con respecto a CMY-2, CMY-26 y CMY-37 (**V, N, I** e **I**) y una homología del 97%, 97.90% y 97.11%. Debido a esto, se realizó un alineamiento con 95 variantes reportadas en la base de datos Lahey y el GenBank para realizar un árbol filogenético de todas estas variantes como se muestra en la figura 20.

El alineamiento con las variantes CMY-26 y CMY-37 (anexo 6) mostró una identidad del 99% y una relación filogenética con éstas mismas variantes como se puede apreciar en la figura 99. Sin embargo, no presentó identidad del 100% con ninguna variante reportada, lo cual sugirió la presencia de un nuevo alelo del gen *bla_{CMY}* encontrado en la cepa BUAP385Cf.

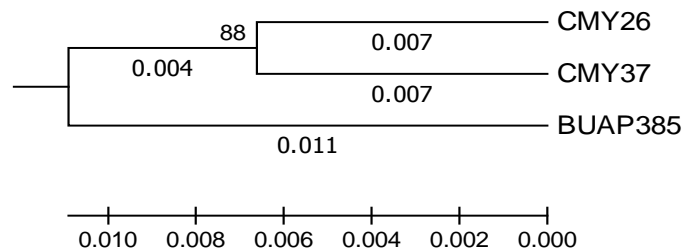


Figura 19. Relación filogenética del gen *bla_{CMY}* en la cepa BUAP385Cf con las variantes 26 y 37. (NG_048821.1, NG_048832.1). MEGA 6.0

La secuencia fue enviada al GenBank donde se asignó el alelo a esta nueva variante de CMY designándola como CMY-144, el número de acceso es KY066478.1.

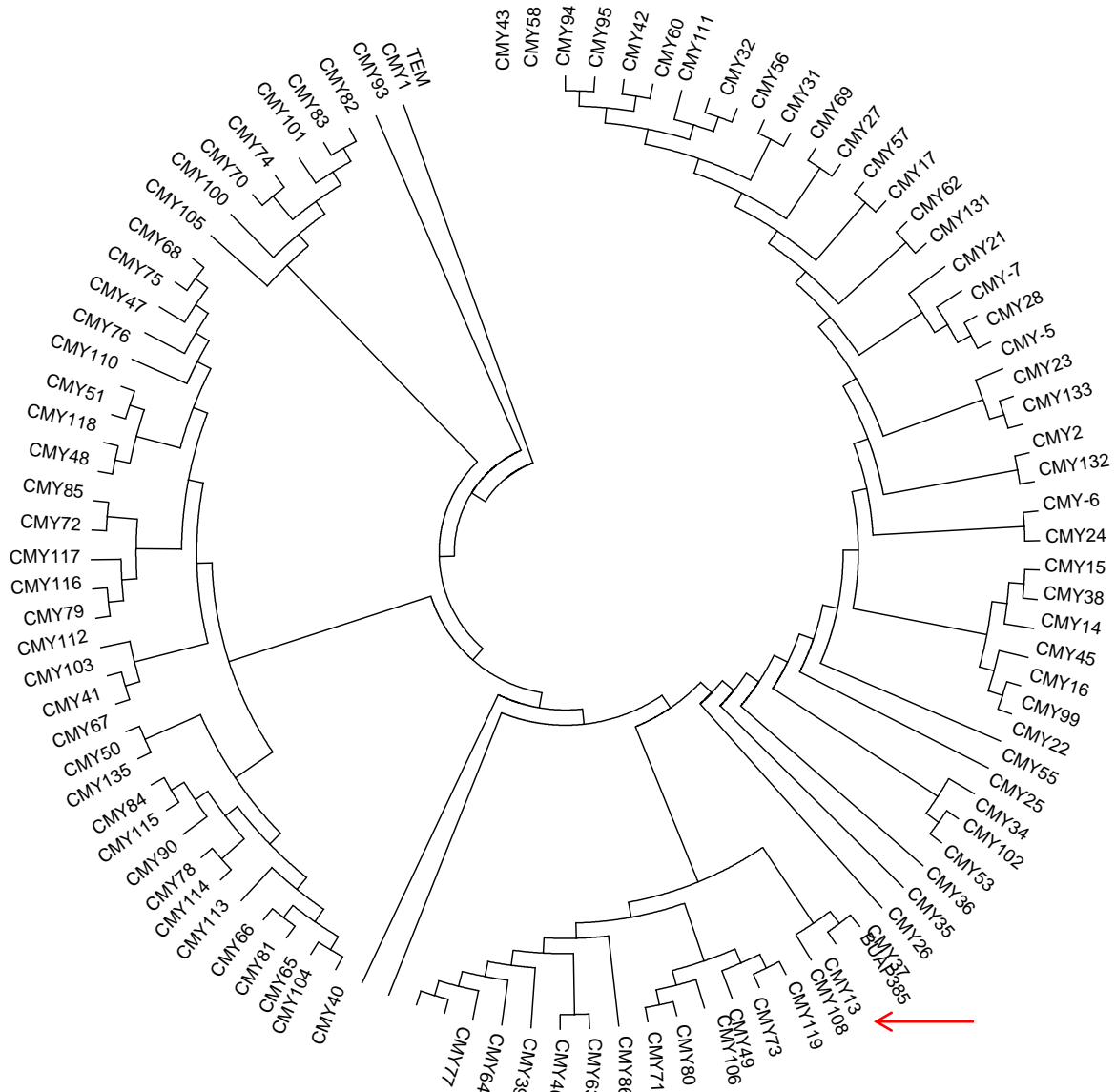


Figura 20. **Árbol filogenético *neighbor-Joining* (NJ) basados en secuencias de 1146 pb del gen *bla*_{CMY-144} de la cepa BUAP385Cf y 95 variantes de éste gen reportadas en el GenBank.** Se realizó un alineamiento de las 95 variantes de CMY reportadas en el GenBank usando en programa BioEdit 2.0 y posteriormente se realizó la construcción del árbol usando el programa MEGA 6.0 usando la β -lactamasa TEM como raíz del árbol.

Entorno genético de CMY-144

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *sugE* (*sugE*-R) y *frdB* (*frdB*-F) de la estructura genética que se muestra en la figura 21 de tal forma que se pudiera caminar dentro de la secuencia de 4252 pb que reportó Miriagou y colaboradores en 2004 en un plásmido (p541-H) de *E. coli*.

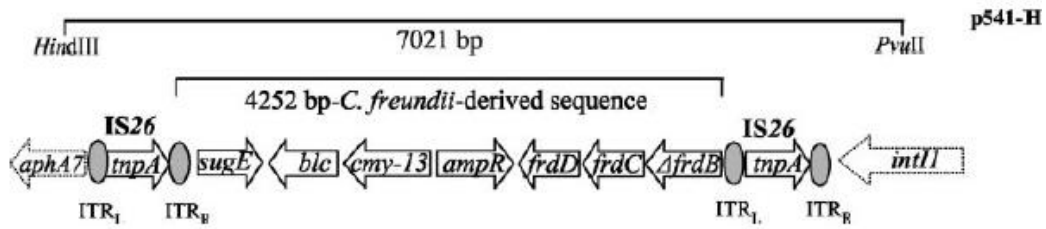


Figura 21. Entorno genético de CMY-13 en el plásmido p541-H (IncN) en *E. coli*. CMY-13 deriva de la misma secuencia de 4252 pb presente en el cromosoma de *C. freundii* (Miriagou *et al.*, 2004).

En la figura 21 se muestra la estrategia que se siguió para secuenciar el entorno genético de CMY-144.

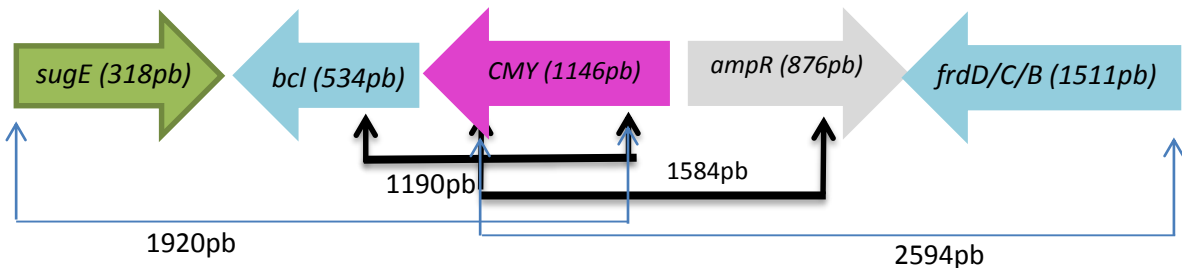


Figura 22. Estrategia para la secuenciación del entorno genético de CMY-144 en la cepa BUAP385Cf. Cabe destacar que el diseño de oligonucleótidos se realizó en dirección 5' → 3' para obtener la secuencia de la cadena sentido.

Los fragmentos amplificados en el entorno genético del gen *bla*_{CMY-144} se muestran a continuación.

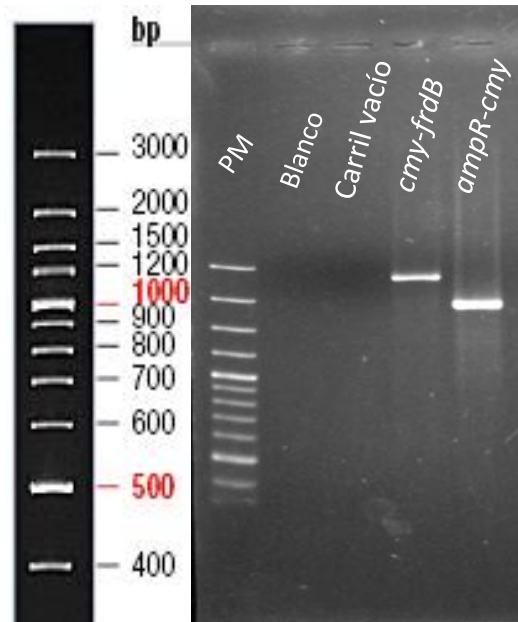


Figura 23. Electroforesis de la amplificación del entorno genético (*sugE-CMY* (1920pb) y *CMY-frdB* (2594pb) en la cepa BUAP385Cf.

El análisis de las secuencias del entorno genético de *bla_{CMY-144}* en la cepa BUAP385Cf, mostró la presencia de los genes *sugE*, *blc*, *ampR*, *frdD*, *frdC* y un fragmento de *frdB*. Esta estructura ya había sido reportada por Miriagou y colaboradores en 2004, dichos genes se encuentran flanqueando el gen de CMY-13. Por primer walking, se obtuvo la estructura que se muestra en la figura 24. Las secuencias completas de los genes se muestran en el anexo 6 y los número de acceso en el genBank son los siguientes: Succinato deshidrogenasa (*frdB*): APC23879.1, fumarato reductasa subunidad C (*frdC*): APC23880.1, fumarato reductasa subunidad D (*frdD*): APC23881.1, activador transcripcional AmpR (*ampR*): APC23882.1, β-lactamasa clase C CMY-144 (*bla_{CMY-144}*): APC23883.1, lipoproteína de membrana externa (*blc*): APC23884.1 y bomba de eflujo de compuestos de amonio cuaternario (*sugE*) APC23885.1.

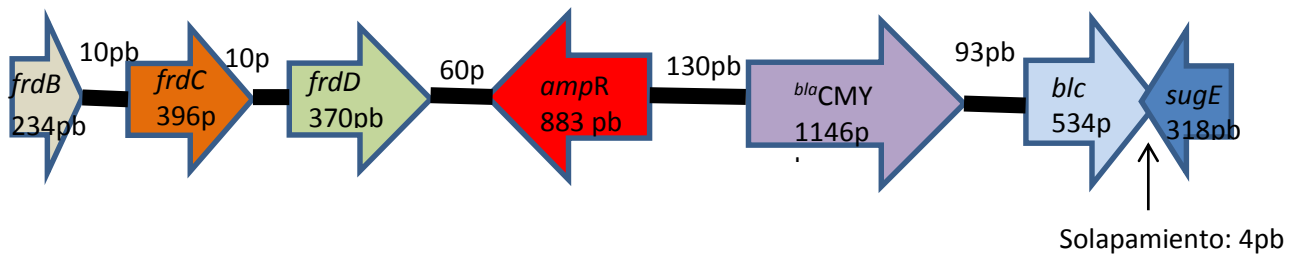


Figura 24. Entorno genético de *bla_{CMY-144}* en la cepa de *C. freundii* BUAP385Cf obtenido por secuenciación. CMY-144 junto con el entorno genético encontrado se reportaron en el GenBank (KY066478.1)

Perfil plasmídico en la cepa de *C. freundii* BUAP385Cf por Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE-S1)

Para determinar la presencia y número de plásmidos, se realizó PFGE usando la nucleasa S1 para digerir el ADN bacteriano, con la finalidad de linealizar los plásmidos. En la figura 25 se muestra el perfil plasmídico por PFGE de la cepa BUAP385Cf en el cual se observó la presencia de dos plásmidos. Tras el hallazgo del gen *bla_{CMY-144}* y la presencia de plásmidos, se realizó ensayos de hibridación para identificar la localización de CMY-144 (cromosómico o plasmídico) en la cepa BUAP385Cf. Sin embargo, los resultados no fueron contundentes y no se muestran en éste trabajo.

Amplificación de genes BLEE en *E. coli*

Se amplificó los genes BLEE en las cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación y con fenotipo BLEE positivo para confirmar la presencia genotípica de éstos e identificar la variante del mismo.

Todas las cepas de *E. coli* analizadas portan la cefotaximasa CTX-M (16/16), 56.25%(9/16) mostró la presencia de TEM y no se encontró la presencia de SHV ni de OXA-1 (gráfica 8). En la tabla 29 se muestran las variantes obtenidas por secuenciación y en el anexo 5 las secuencias.

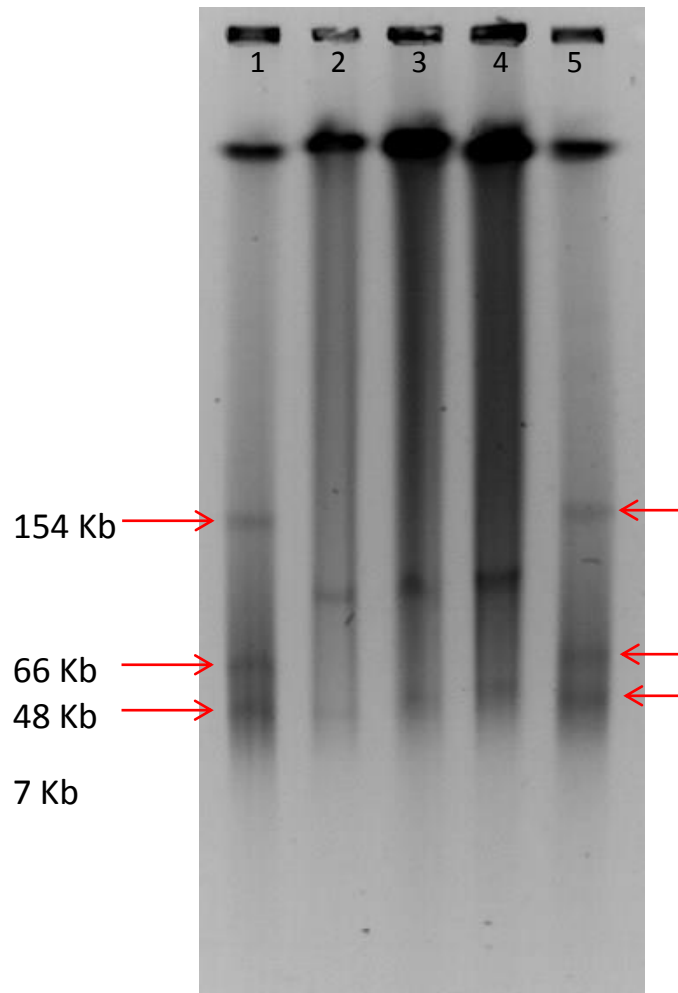
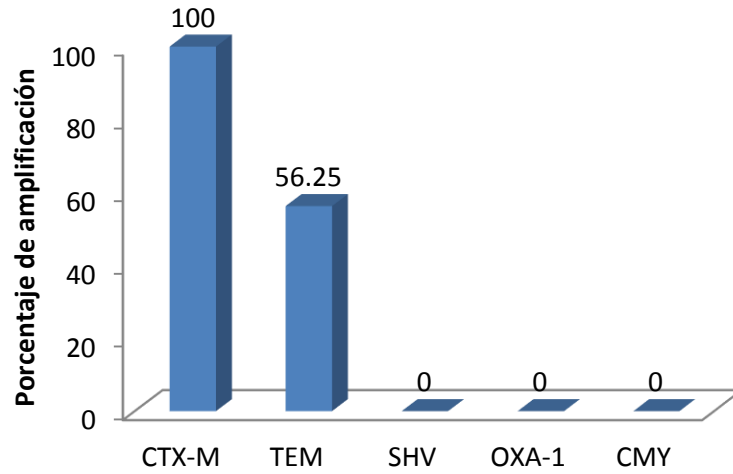


Figura 25. Perfil plasmídico por PFGE-S1 de la cepa de *C. freundii* BUAP385Cf. Carril 1 y 5: *E. coli* NCTC50192, Carril 2,3 y 4: Cepa BUAP385Cf. Se usó la cepa NTCC50192 como control debido a que se conocen por secuenciación el tamaño de los 4 plásmidos que porta.



Gráfica 8. **Porcentaje de amplificación de CTX-M, TEM, SHV y OXA-1 en las cepas de *E. coli* aisladas de leche.** Todas las cepas de *E. coli* portan CTX-M y el 56.25% TEM. Ninguna porta el gen SHV, OXA-1 y CMY.

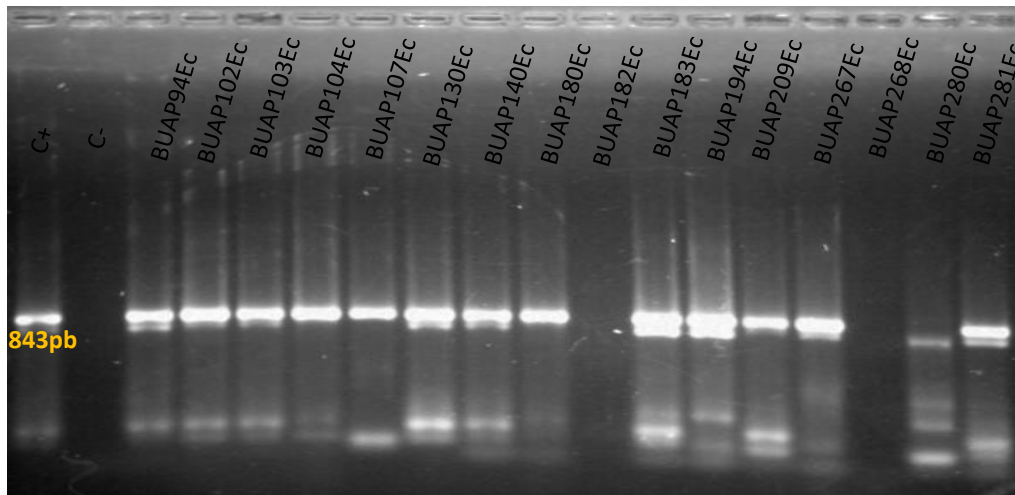


Figura 26. **Electroforesis de la amplificación de CTX-M en las cepas de *E. coli*.** Se usó la cepa 1550 que porta CTX-M-15 como control positivo. Las cepas BUAP182Ec, BUAP268Ec y BUAP280Ec se repitieron y fueron positivos a la amplificación.

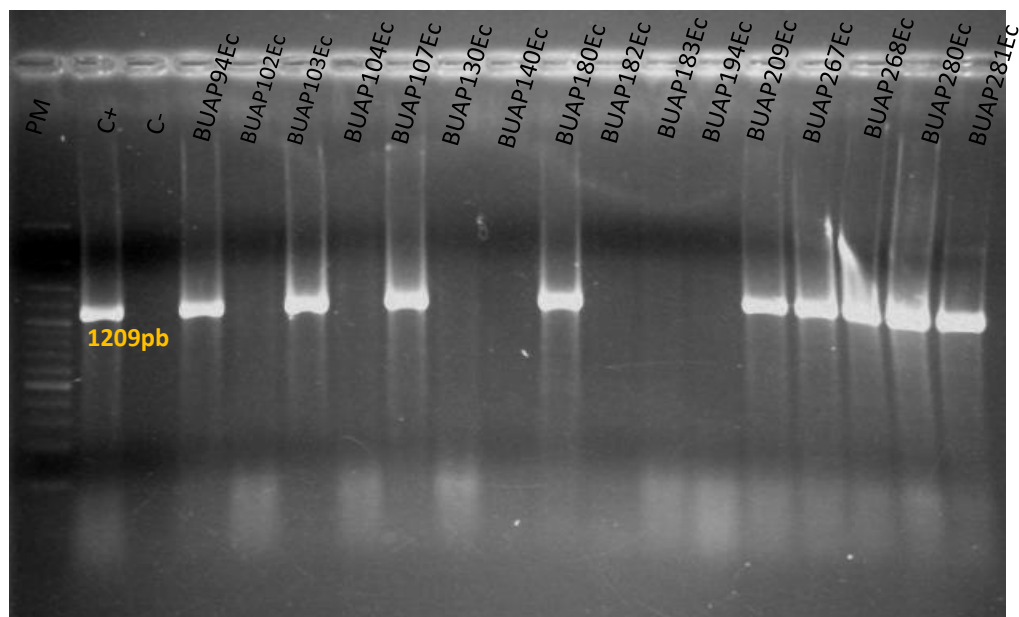


Figura 27. Electroforesis de la amplificación de TEM en las cepas de *E. coli*. El amplificado esperado es de 1209 en el cepa control (1550).

TABLA 29. VARIANTES DE CTX-M Y TEM EN LAS CEPAS DE *E. coli* OBTENIDAS POR SECUENCIACIÓN

Cepa	Fenotipo BLEE	Variante BLEE	
		CTX-M	TEM
BUAP94Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-28	TEM-1
BUAP102Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP103Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP104Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP107Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP130Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-1	TEM-1
BUAP140Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP180Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP182Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP183Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP194Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-28	TEM-1
BUAP209Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M.79	TEM-1
BUAP267Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP268Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	TEM-1
BUAP280Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-27	TEM-1
BUAP281Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M: ND	TEM-1

ND: no determinado

Objetivo 5. Identificar genes que codifican para β -lactamasas con actividad carbapenemasa como IMP, GES y KPC en aquellas cepas resistentes a carbapenémicos.

La resistencia intermedia a imipenem de las cepas A7 y A10 fue comprobada por CMI; en la tabla 30 se muestran los valores de CMI para imipenem en las cepas de *Citrobacter* spp., que fueron resistentes y resistentes intermedios por el método de Kirby-Baüer.

TABLA 30. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN LAS CEPAS DE *Citrobacter* spp.

Cepa	Kirby-Baüer	CMI IPM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		S: ≤ 1	I: 2 R: >4
Ps91 (c+)	R	64	R
Ec180 (c-)	S	0	S
BUAP454Cf	I	0.5	S
BUAPA7Cb	I	2	I
BUAPA8Cf	I	0.5	S
BUAPA9Cy	I	1	S
BUAPA10Cy	R	2	I
BUAPA11Cf	I	1	S

C+: cepa control positivo *P. aeruginosa*; C-: cepa control negativo *E. coli*, S: sensible, R: resistente, I: intermedio

Se realizó la amplificación de IMP, KPC y GES-1 en las cepas mencionadas en la tabla 32, sin embargo, no se obtuvieron amplificadores positivos para estos genes.

Objetivo 6. Identificar mutaciones en genes cromosómicos (*parC*, *gyrA*) e identificar genes plasmídicos (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, variante *acc(6')-Ib-cr*, *qepA* y *OqxA/B*) involucrados en la resistencia a quinolonas.

Selección de cepas

Las cepas mostradas en la tabla 31 que fueron resistentes a una o más quinolonas, se seleccionaron para amplificar los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, variante *acc(6')-Ib-cr*, *qepA* y *OqxA/B* y secuenciar *gyrA* y *parC* involucrados en la resistencia a quinolonas.

TABLA 31. ORIGEN Y FENOTIPO DE RESISTENCIA A QUINOLONAS DE LAS CEPAS DE *Citrobacter* spp., Y *E. coli*

Origen	Cepa	Bacteria	Fenotipo de resistencia
Pollo	BUAP362Cf	<i>C. freundii</i> .	LVX, CIP, NA
Pollo	BUAP385Cf	<i>C. freundii</i> .	LVX, CIP
Pollo	BUAP395Cf	<i>C. freundii</i> .	NA
Pollo	BUAP400Cf	<i>C. freundii</i> .	LVX, CIP, NA
Clínica	BUAPA10Cy	<i>C. youngoe</i>	LVX, CIP, NA
Clínica	BUAPA11Cf	<i>C. freundii</i>	CIP
	BUAP103Ec	<i>E. coli</i>	LVX, CIP, NA
	BUAP107Ec	<i>E. coli</i>	LVX, CIP, NA
	BUAP140Ec	<i>E. coli</i>	LVX, CIP, NA
	BUAP182Ec	<i>E. coli</i>	LVX, CIP, NA
Leche	BUAP183Ec	<i>E. coli</i>	CIP, NA
	BUAP209Ec	<i>E. coli</i>	LVX, CIP, NA
	BUAP268Ec	<i>E. coli</i>	LVX, CIP, NA
	BUAP280Ec	<i>E. coli</i>	LVX, CIP, NA
	BUAP281Ec	<i>E. coli</i>	CIP, NA

LVX: levofloxacino; CIP: ciprofloxacino; NA: ácido nalidíxico.

Mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas en los genes *gyrA* y *parC*.

Al analizar las secuencias de *gyrA* y *parC* en las cepas de *Citrobacter* spp., se identificaron las mutaciones en la posición 83 (Thr83Ile), 84 (Ala84Cys) y 85 (Val85Gly) en el gen *gyrA* y las mutación en la posición 80 (Ser80Ile) en el gen *parC*. Estas mutaciones se muestran en la tabla 32.

TABLA 32. REPORTE DE MUTACIONES EN LOS GENES *gyrA* Y *parC* EN LAS CEPAS DE *Citrobacter* spp., ENCONTRADAS POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Cepa		Cambio de aminoácido				
		GyrA			ParC	
		83	84	85	80	84
	ATCC 8090	Thr	Ala	Val	Ser	Glu
BUAP362Cf	<i>C. freundii</i>	Ile	WT	WT	WT	WT
BUAP385Cf	<i>C. freundii</i>	Ile	Cys	WT	WT	WT
BUAP395Cf	<i>C. freundii</i>	Ile	WT	WT	WT	WT
BUAP400Cf	<i>C. freundii</i>	Ile	WT	Gly	Ile	WT

BUAPA10Cy	<i>C. youngoe</i>	Ile	WT	WT	WT	WT
BUAPA11Cf	<i>C. freundii</i>	Ile	WT	Gly	WT	WT

WT (wild type): aminoácido idéntico a la cepa silvestre. Thr: treonina; Ile: isoleucina; Ala: alanina; Cys: cisteína; Val: valina; Gly: glicina; Ser: serina; Glu: ácido glutámico.

En la cepas de *E. coli*, se identificaron las mutaciones en la posición 83 (Ser83Leu) y 87 (Asp87Asn; en la cepa BUAP140Ec la mutación Asp87Tyr) en el gen *gyrA* y en las posiciones 80 (Ser80Leu y Ser80Ile) y 84 (Glu84Gly) del gen *parC*. Estos datos se muestran en la tabla 33.

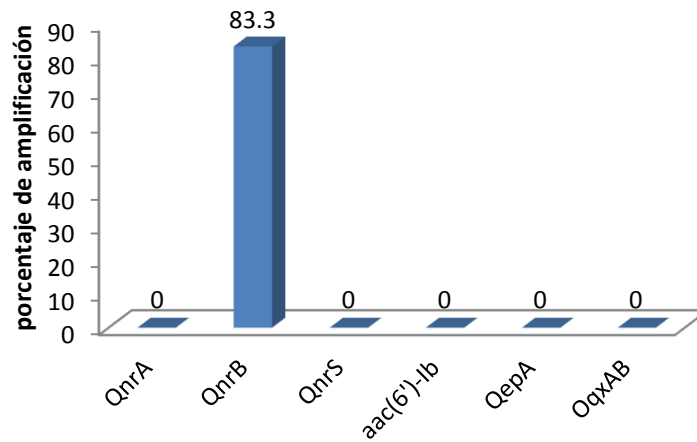
TABLA 33. REPORTE DE MUTACIONES EN LOS GENES *gyrA* Y *parC* DE LAS CEPAS DE *E. coli* ENCONTRADAS POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Cepa	Cambio de aminoácido			
	GyrA		ParC	
	83	87	80	84
<i>E. coli</i> K12	Ser	Asp	Ser	Glu
BUAP103Ec <i>E. coli</i>	Leu	Asn	Leu	WT
BUAP107Ec <i>E. coli</i>	WT	Asn	Ile	WT
BUAP140Ec <i>E. coli</i>	WT	Tyr	Leu	WT
BUAP182Ec <i>E. coli</i>	Leu	Asn	Leu	WT
BUAP183Ec <i>E. coli</i>	Leu	Asn	Leu	WT
BUAP209Ec <i>E. coli</i>	Leu	Asn	Leu	WT
BUAP268Ec <i>E. coli</i>	Leu	Asn	Leu	WT
BUAP280Ec <i>E. coli</i>	Leu	Asn	Ile	Gly
BUAP281Ec <i>E. coli</i>	WT	Asn	Ile	Gly

WT (wild type): aminoácido idéntico a la cepa silvestre. Tyr: tirosina; Ile: isoleucina; Asn: asparagina; Leu: leucina; Gly: glicina; Ser: serina; Glu: Asp: ácido aspártico.

Amplificación de genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas

En los aislados de *Citrobacter* spp., se obtuvo el 83.3% (5/6) de amplificación para el gen *qnrB* (gráfica 9) y el amplificado se muestra en la figura 28. Ninguna cepa de *E. coli* amplificó este gen. Igualmente, ninguna de las cepas de *Citrobacter* spp y *E. coli*, amplificaron los genes *qnrA*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *qepA* y *oqxA/B*.



Gráfica 9. Amplificación de los genes involucrados en la resistencia quinolonas en las cepas de *Citrobacter* resistentes a estos antibióticos.

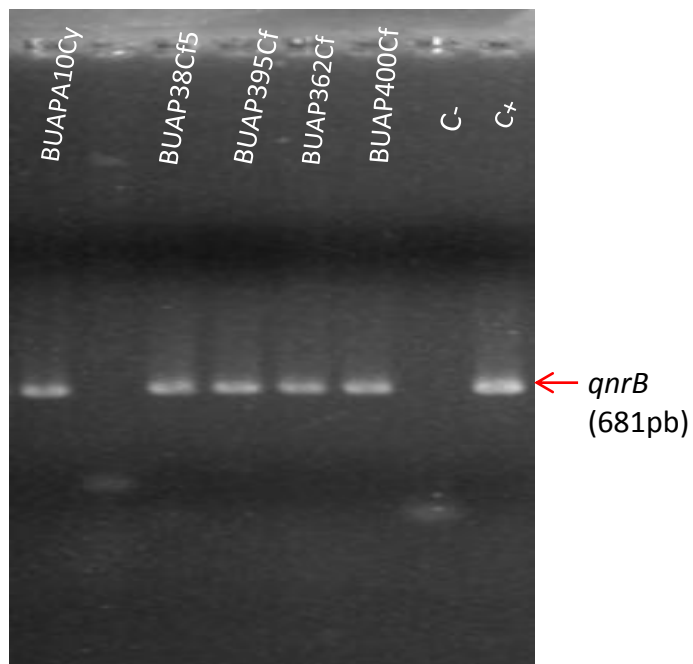


Figura 28. Amplificación del gen *qnrB* en las cepas de *Citrobacter* spp.

Objetivo 7. Identificar genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol.

Aquellas cepas que fueron resistentes a gentamicina y/o amikacina, tetraciclina y cloranfenicol, fueron seleccionadas para la amplificación de genes involucrados en la resistencia a éstos antibióticos. En la tabla 34 se muestra el fenotipo y genotipo de las cepas de *Citrobacter* spp., y *E. coli* seleccionadas.

TABLA 34. CEPAS SELECCIONADAS PARA AMPLIFICAR LOS GENES *aac(3')-II*, *tetA/B* y *cmIA*

Origen	Clave	Bacteria	Fenotipo resistencia	de Genotipo resistencia	de
Cilantro	BUAPA6Cf	<i>C. freundii</i> .	TE	<i>tet(A)</i>	
Pollo	BUAP362Cf	<i>C. freundii</i> .	GM	NA	
Pollo	BUAP385Cf	<i>C. freundii</i> .	GM	NA	
Pollo	BUAP395Cf	<i>C. freundii</i> .	GM, TE	<i>tet(B)</i>	
Pollo	BUAP400Cf	<i>C. freundii</i> .	GM, TE, C	<i>aac(3')-II</i>	
Portador	BUAP454Cf	<i>C. freundii</i> .	GM	<i>aac(3')-II</i>	
Portador	BUAP458Cf	<i>C. freundii</i> .	GM	NA	
Clínica	BUAPA7Cb	<i>C. brakii</i>	GM	NA	
Clínica	BUAPA10Cy	<i>C. youngoe</i>	GM, TE, C	NA	
Clínica	BUAPA11Cf	<i>C. freundii</i>	GM	NA	
Leche	BUAP94Ec	<i>E. coli</i>	TE	<i>tet(A)</i>	
Leche	BUAP102Ec	<i>E. coli</i>	GM,TE	<i>tet(A)/(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP103Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE, C	<i>tet (B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP104Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE, C	<i>tet(A)/(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP107Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE	<i>tet(A)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP130Ec	<i>E. coli</i>	TE	<i>tet(A)</i>	
Leche	BUAP140Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE, C	<i>tet(A)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP180Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE, C	<i>tet (A)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP182Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE, C	<i>tet(A)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP183Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE, C	NA	
Leche	BUAP194Ec	<i>E. coli</i>	TE	<i>tet(A)</i>	
Leche	BUAP209Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE, C	<i>tet(A)/(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP267Ec	<i>E. coli</i>	TE	<i>tet(B)</i>	
Leche	BUAP268Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE	<i>aac(3)-II</i>	
Leche	BUAP280Ec	<i>E. coli</i>	GM, TE	<i>tet(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	

Leche	BUAP281Ec	<i>E. coli</i>	TE	<i>tet(B)</i>
-------	-----------	----------------	----	---------------

NA: no amplificó; GM: gentamicina; TE: tetraciclina; C: cloranfenicol.

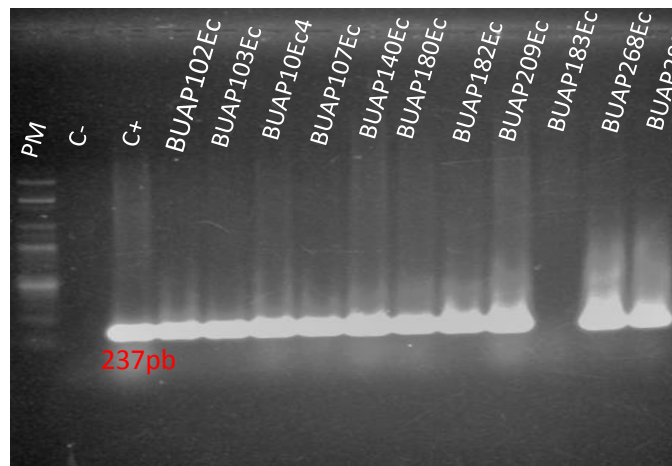
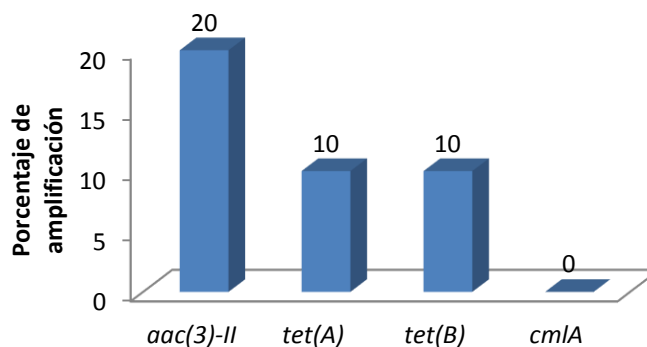


Figura 29. Amplificación del gen *aac(3')-II* en cepas de *E. coli* aislados de leche.

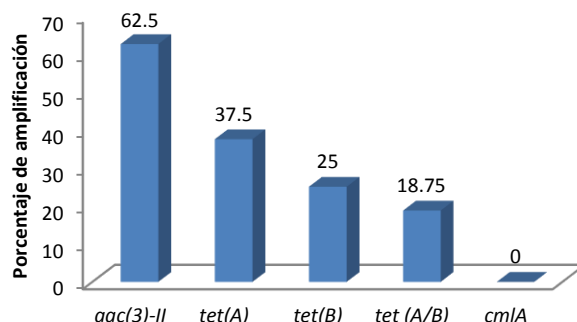
El 20% de las cepas de *Citrobacter spp.*, amplificó el gen *aac(3')-II*, 10% (1/10) amplificó el gen *tetA* y de igual forma el gen *tetB*. No se obtuvieron amplificados positivos para el gen *cmIA* (gráfica 10)..



Gráfica 10. Amplificación de los genes *aac(3')-II*, *tet(A)*, *tet(B)* y *cmIA* en las cepas de *Citrobacter spp.*

En la gráfica 11 se observa que en las cepas de *E. coli* amplificaron el 62.5% (10/16) para el gen *aac(3')-II*, 37.5% (6/16) para el gen *tet(A)*, 25% para el gen *tet(B)*, 18.75% (3/16)

para ambos genes (*tet (A)* y *tet (B)*) en la misma cepas y 0% de amplificación para el gen *cmIA*.



Gráfica 11. Amplificación de los gene *aac(3')-II*, *tet(A)*, *tet (B)* y *cmIA* en las cepas de *E. coli*.

Objetivo 8. Determinar el perfil plasmídico de algunas cepas multirresistentes de *Citrobacter spp.*, y de *E. coli* y caracterizar parcialmente los plásmidos involucrados en la resistencia.

Caracterización parcial de plásmidos en *Citrobacter spp.*

Las cepas de *Citrobacter spp.*, que amplificaron genes comúnmente codificados en plásmidos (*bla_{CTX-M}* y *qnrB*), fueron seleccionadas para realizar el perfil plasmídico. En la tabla 35 se muestran las cepas de *Citrobacter spp.*, seleccionadas para la caracterización parcial de plásmidos.

TABLA 35. CEPAS DE *Citrobacter spp.*, SELECCIONADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PLÁSMIDOS

Origen	Cepa	Bacteria	Fenotipo de resistencia	Genotipo de resistencia
Pollo	BUAP362Cf	<i>C. freundii</i> .	AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, GM, LVX, CIP, NA	<i>bla_{TEM-1b}</i> , <i>bla_{SHV-12}</i> , <i>bla_{CMY}</i> , <i>qnrB11</i>
Pollo	BUAP385Cf	<i>C. freundii</i> .	AMC, AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, FOX, GM, LVX, CIP,NA	<i>bla_{TEM-1b}</i> , <i>bla_{CMY}</i> , <i>qnrB11</i>
Pollo	BUAP395Cf	<i>C. freundii</i> .	AMC, AMP, PIP, CTX, FOX, GM, NA, TE	<i>bla_{CTX-M-177}</i> , <i>bla_{CMY}</i> , <i>qnrB10</i>
Pollo	BUAP400Cf	<i>C. freundii</i> .	AMC, AMP, PIP, CTX, FOX, GM, LVX, CIP, NA, C, TE	<i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{CMY}</i> , <i>qnrB6</i>

Clínica	BUAPA6Cf	<i>C. youngoe</i>	AMC, FOX	<i>bla</i> _{CTX-M-12} , <i>bla</i> _{CMY}
Clínica	BUAPA10Cy	<i>C. youngoe</i>	AMC, AMP, FOX, GM	<i>bla</i> _{CMY} , <i>qnrB10</i>

Extracción plasmídica con miniprep para identificar la presencia de plásmidos

En la figura 30 se muestra la extracción plasmídica con el kit miniprep (QIAprep Spin miniprep kit). En dicha extracción se observa la presencia de plásmidos en las cepas BUAP385Cf, BUAP395Cf, BUAPA6Cf y BUAPA10Cy que pudieran ser los portadores de los genes de resistencia plasmídicos encontrados en estas cepas. Por otro lado, mediante estas condiciones de extracción, no se observó la presencia de plásmidos en las cepas BUAP362Cf y BUAP400Cf.

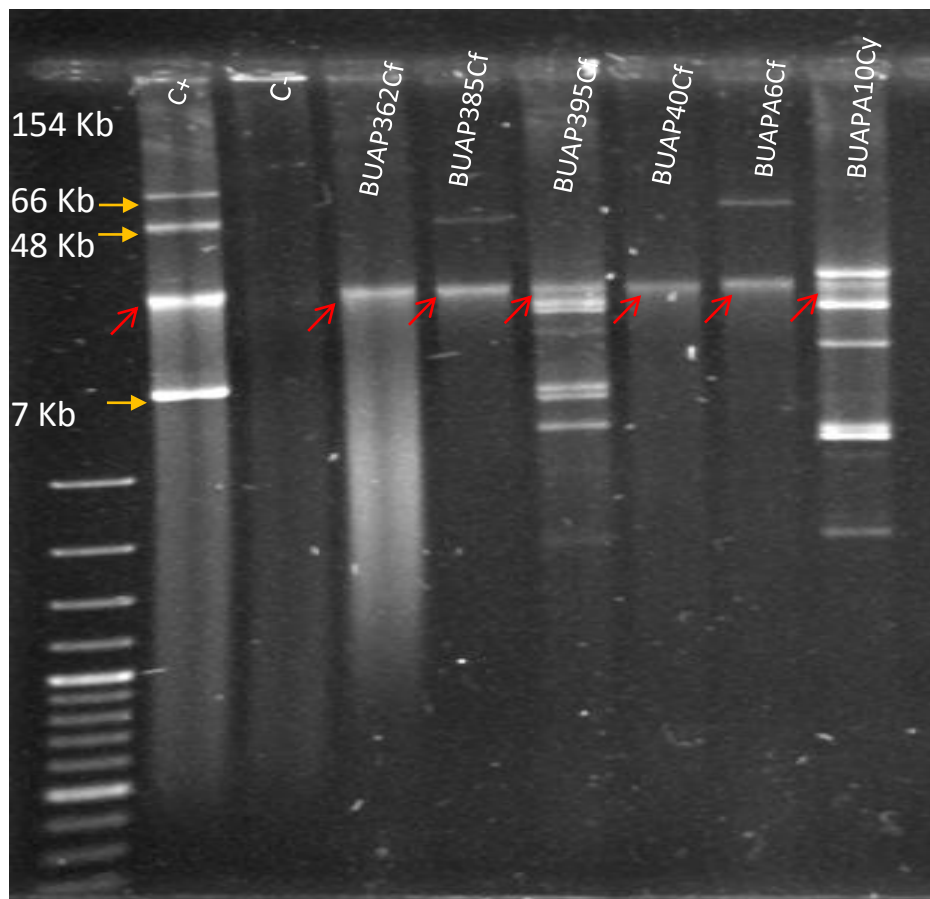


Figura 30. Perfil plasmídico en las cepas de *Citrobacter* spp. C+: perfil plasmídico de *E. coli* NCTC50192 (7Kb, 48Kb, 66Kb y 154Kb, el cual no se aprecia). La probable contaminación con ADN cromosómico se encuentra señalando con flechas rojas y las bandas sin señalar corresponden a plásmidos.

Para clasificar los plásmidos con base a su grupo de incompatibilidad en las cepas de *Citrobacter* spp., se realizó la amplificación de replicones por el método de PBRT; sin embargo, no hubo la amplificación a alguno de éstos replicones. Cabe destacar que la técnica sólo nos permite la identificación de 18 de los más de 27 replicones que se han descrito en enterobacterias (Carattoli, 2005).

Se optó por realizar la clasificación de plásmidos mediante el uso de primers degenerados para amplificar las familias MOB donde se buscaron 14 de las 16 familias de relaxasas descritas por éste método. Se identificó la presencia de la subfamilia MOB P51 (figura 38) en la cepa BUAP395Cf y la presencia de la subfamilia MOB C12 en las cepas BUAP395Cf y BUAPA10Cy (figura 31), (Alvarado *et al*, 2012).

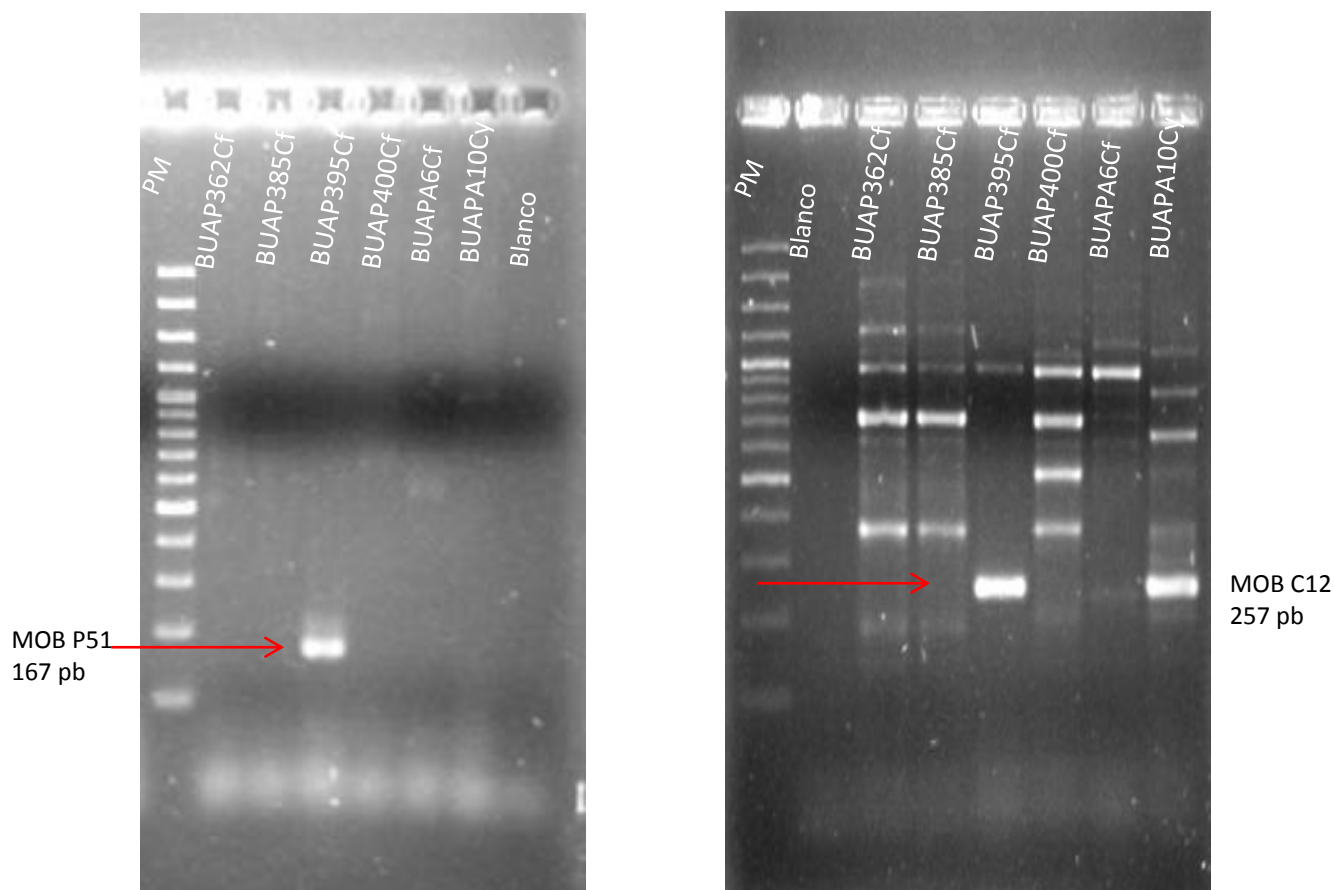


Figura 31. Amplificación de la subfamilia de plásmidos MOB P51 (izquierda) y MOB C12 (derecha) en las cepas de *Citrobacter* spp.

Caracterización parcial de plásmidos en las cepas de *E. coli*

Por las características genotípicas (presencia de CTX-M), todas las cepas de *E. coli* fueron seleccionadas para la caracterización parcial de plásmidos. En la figura 32 se muestran los resultados de la extracción con el kit miniprep. Mediante éste método se observó la presencia de plásmidos en las cepas BUAP94Ec, BUAP102Ec, BUAP103Ec, BUAP104Ec, BUAP107Ec, BUAP140Ec, BUAP180Ec, BUAP182Ec, BUAP183Ec, BUAP2009Ec, BUAP280Ec y BUAP281Ec y no se observó la presencia de éstos en las cepas BUAP 130Ec, BUAP 194Ec, BUAP267Ec y BUAP268Ec.

En la tabla 36 se muestran los replicones obtenidos por el método PBRT. Se obtuvo un 56.25% (9/16) del replicón FIB, 32.25% (5/16) del replicón I1-Iy, 12.5% del replicón FIA y 6.5% (1/16) del replicón B/O.

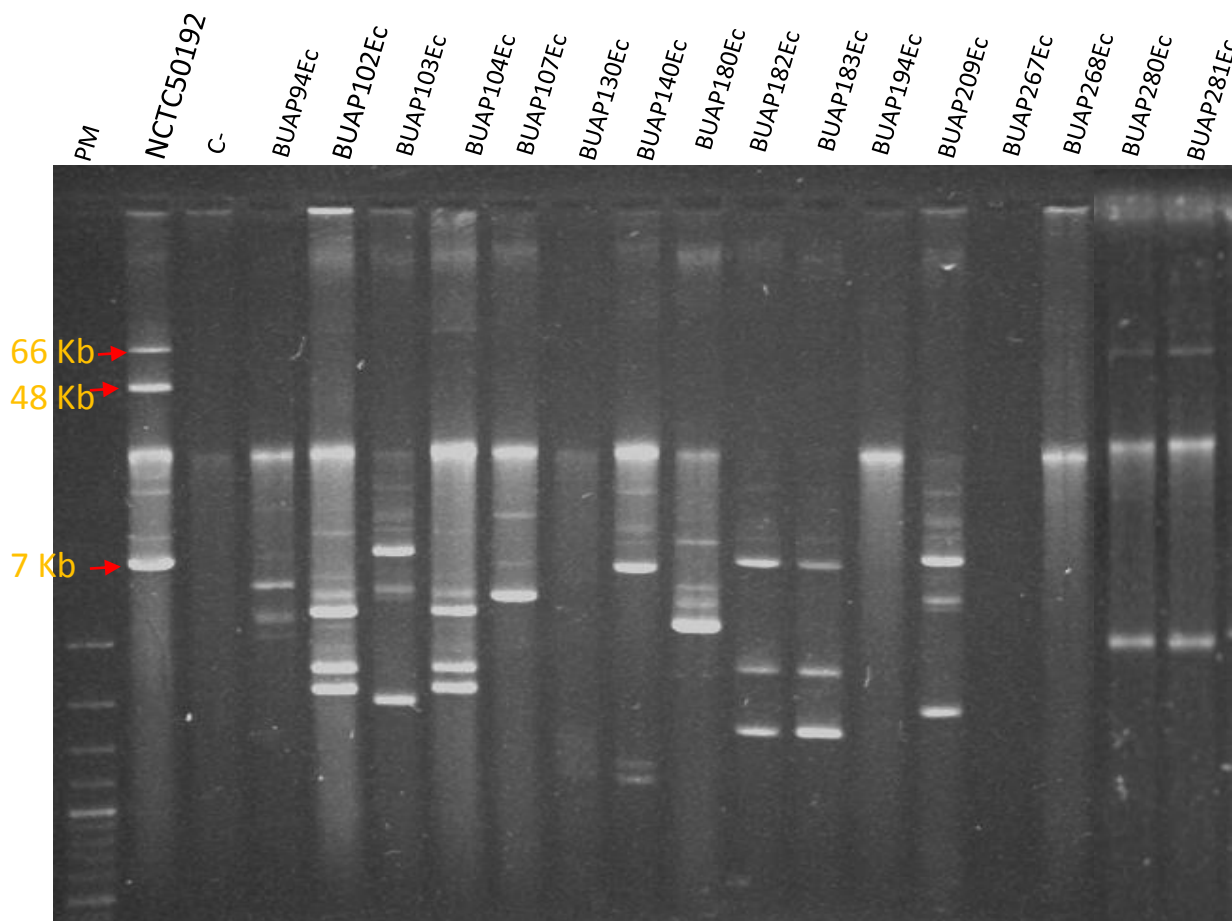


Figura 32. Perfil plasmídico en las cepas de *E. coli*. C+: perfil plasmídico de *E. coli* NCTC50192 (7Kb, 48Kb, 66Kb y 154Kb, el cual no se aprecia). Las cepas donde no se aprecian plásmidos se repitieron entontrando el mismo resultado. Sin embargo, se realizó otra extracción usando la técnica de Eckhardt donde se apreciaron plásmidos más grandes (daton no presentados).

TABLA 36. FENOTIPO, GENOTIPO Y REPLICONES EN LAS CEPAS DE *E. coli*

Cepa	Fenotipo BLEE	BLEE	Replicones
BUAP94Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-28, TEM-1b	I1-I γ , FIB
BUAP102Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	I1-I γ , FIB
BUAP103Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79, TEM-1b	FIB
BUAP104Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	I1-I γ , FIB
BUAP107Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79, TEM-1b	FIB
BUAP130Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-1	I1-I γ , FIB
BUAP140Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	FIB, (B/O)
BUAP180Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79, TEM-1b	(-)
BUAP182Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	(-)
BUAP183Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79	(-)
BUAP194Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-28	I1-I γ
BUAP209Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M.79, TEM-1b	FIB
BUAP267Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79, TEM-1b	FIB
BUAP268Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-79, TEM-1b	(-)
BUAP280Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M-27, TEM-1b	FIA
BUAP281Ec	ATM, CTX, FEP, CAZ	CTX-M, TEM-1b	FIA

ATM: aztreonam; CTX: cefotaxima; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidima, (-): negativo a la amplificación.

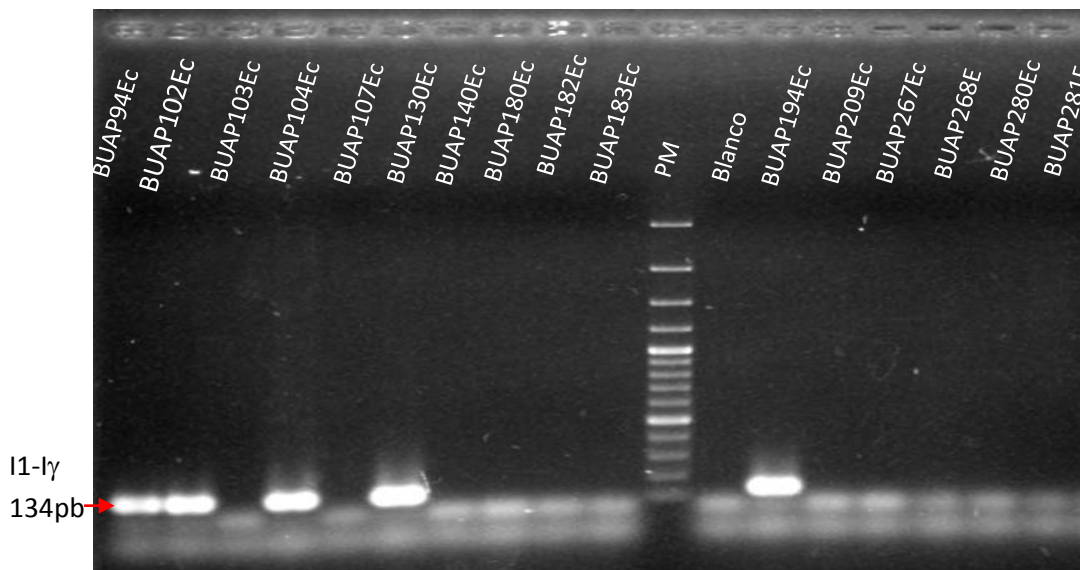


Figura 33. **Múltiplex 1 del método PBRT.** Amplificación de los replicones HI1 (471pb), HI2 (644pb) y I1-I γ (134pb) en las cepas de *E. coli*.

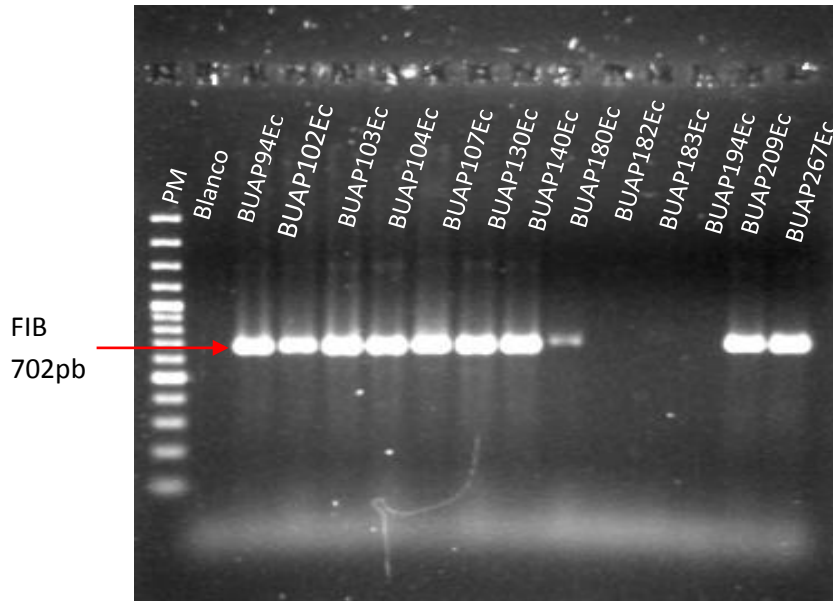


Figura 34. **Múltiplex 3 del método PBRT.** Amplificación de los replicones FIA (462pb), FIB (702pb) y W (300 pb) en las cepas de *E. coli*.

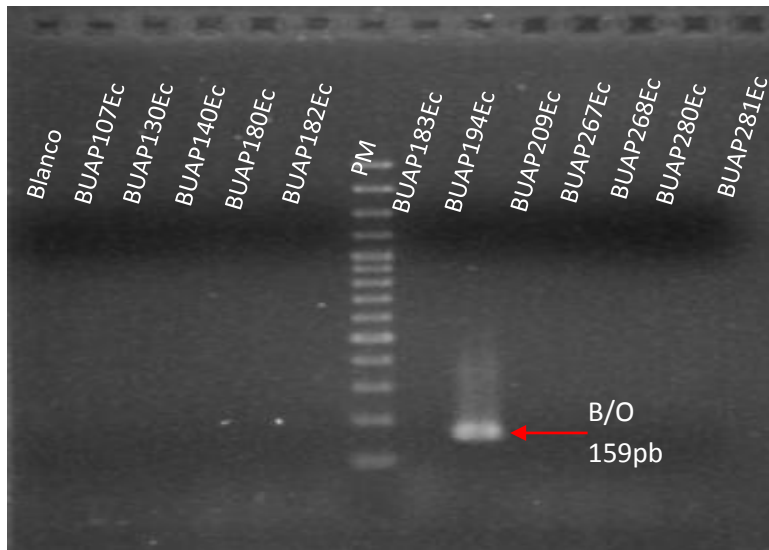


Figura 35. **Simplex 3 del método PBRT.** Amplificación de del replicón B/O (159pb) en las cepas de *E. coli*.

Por último, en la tabla 37 y 38 se muestra el resumen de resultados en las cepas de *Citrobacter spp.*, y *E. coli* respectivamente.

TABLA 36. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS EN LAS CEPAS DE *Citrobacter* spp., AISLADAS DE MUESTRAS ALIMENTARIAS Y CLÍNICAS

Cepa		Bacteria	Fenotipo de resistencia	Fenotipo BLEE	Genotipo de resistencia	Otros genes	Familia MOB
Origen	Clave						
Pollo	BUAP362Cf	<i>C. freundii.</i>	AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, GM, LVX, CIP, NA	-	TEM-1, SHV-12 CMY, QnrB11		
Pollo	BUAP385Cf	<i>C. freundii.</i>	AMC, AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, FOX, GM, LVX, CIP, NA	-	TEM-1, CMY, QnrB11		
Pollo	BUAP395Cf	<i>C. freundii.</i>	AMC, AMP, PIP, CTX, FOX, GM, NA, TE	-	CTX-M, CMY, QnrB10	<i>tet(B)</i>	P51, C12
Pollo	BUAP400Cf	<i>C. freundii.</i>	AMC, AMP, PIP, CTX, FOX, GM, LVX, CIP, NA, C, TE	+	CTX-M, CMY, QnrB6	<i>aac(3)-II</i>	
Portador	BUAP453Cf	<i>C. freundii.</i>	AMC, FOX	-	CMY		
Portador	BUAP454Cf	<i>C. freundii.</i>	AMC, AMP, FOX, GM	-	CMY,	<i>aac(3)-II</i>	
Portador	BUAP458Cf	<i>C. freundii.</i>	AMP, FOX, GM	+	CMY		
Portador	BUAP460Cf	<i>C. freundii.</i>	FOX	-	CMY		
Hoja de cilantro	BUAPA6Cf	<i>C. freundii.</i>	AMC, PIP, CTX, ATM, FOX, TE	-	CTX-M, CMY,	<i>tet(A)</i>	
Clínica	BUAPA7Cb	<i>C. brakii</i>	AMC, AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, TZP, FOX, IMP ¹ , GM	+	CMY		
Clínica	BUAPA8Cf	<i>C. freundii</i>	AMC, AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, TZP, FOX	+	CMY		
Clínica	BUAPA9Cy	<i>C. youngoe</i>	AMC, AMP, FOX, C	+			
Clínica	BUAPA10Cy	<i>C. youngoe</i>	AMC, AMP, PIP, TZP, FOX, IMP ¹ , GM, LVX, CIP, NA, C, TE	-	CMY, QnrB10		C12
Clínica	BUAPA11Cf	<i>C. freundii</i>	AMC, AMP, FOX, GM, CIP	-	CMY		

AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico; FOX: Cefoxitina; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacina; GM: Gentamicina; NA: Ácido nalidíxico; CIP: Ciprofloxacino; LVX: Levofloxacino; C: Cloranfenicol; TE: Tetraciclina.

TABLA 37. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS EN LAS CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DE LECHE DE VACA

Cepa		Filogrupo	Fenotipo de resistencia	Fenotipo BLEE	Genotipo de resistencia	Replicón
Clave	Bacteria					
BUAP94Ec	<i>E. coli</i>	B1	AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, TE	+	CTX-M-28, TEM-1, <i>tet(A)</i>	I1/8, FIB
BUAP102Ec	<i>E. coli</i>	B1	AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, NA, C, TE	+	CTX-M-79, <i>tet(A)/(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	I1/8, FIB
BUAP103Ec	<i>E. coli</i>	C	AMP, PIP, CTX, TZP, GM, LVX, CIP, NA, C, TE	+	CTX-M-79, <i>tet(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	FIB
BUAP104Ec	<i>E. coli</i>	B1	AMP, PIP, CTX, CAZ, TZP, GM, NA, C, TE	+	CTX-M-79, <i>tet(A)/(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	I1/8, FIB
BUAP107Ec	<i>E. coli</i>	F	AMP, PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM, GM, LVX, CIP, NA, TE	+	CTX-M-79, TEM-1 <i>tet(A)</i> , <i>aac(3)-II</i>	FIB
BUAP130Ec	<i>E. coli</i>	C	AMP, PIP, CTX, TE	+	CTX-M-1, <i>tet(A)</i>	I1/8, FIB
BUAP140Ec	<i>E. coli</i>	C	AMP, PIP, CTX, CAZ, GM, LVX, CIP, NA, C, TE	+	CTX-M-79 <i>tet(A)</i> , <i>aac(3)-II</i>	FIB, (B/O)
BUAP180Ec	<i>E. coli</i>	A	AMP, PIP, CTX, CAZ, GM, C, TE	+	CTX-M-79, TEM-1, <i>tet(A)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
BUAP182Ec	<i>E. coli</i>	A	AMP, PIP, CTX, ATM, GM, LVX, CIP, NA, C, TE	+	CTX-M-79, <i>tet(A)</i> , <i>aac(3)-II</i>	
BUAP183Ec	<i>E. coli</i>	A	AMP, PIP, CTX, CAZ, GM, CIP, NA, C, TE	+	CTX-M-79	
BUAP194Ec	<i>E. coli</i>	A	AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, TZP, TE	+	CTX-M-28, <i>tet(A)</i>	I1/8
BUAP209Ec	<i>E. coli</i>	C	AMC, AMP, PIP, CTX, ATM, TZP, GM, LVX, CIP, NA, C, TE		CTX-M-79, TEM-1, <i>tet(A)/(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	FIB
BUAP267Ec	<i>E. coli</i>	D	AMP, PIP, CTX, CAZ, ATM, TE	+	CTX-M-79, TEM-1, <i>tet(B)</i>	FIB
BUAP268Ec	<i>E. coli</i>	B1	AMP, PIP, CTX, CAZ, GM, LVX, CIP, NA, TE	+	CTX-M-79, TEM-1, <i>aac(3)-II</i>	
BUAP280Ec	<i>E. coli</i>	F	AMP, PIP, CTX, LVX, CIP, NA, TE	+	CTX-M-27, TEM-1, <i>tet(B)</i> , <i>aac(3)-II</i>	FIA
BUAP281Ec	<i>E. coli</i>	F	AMP, PIP, CTX, CIP, NA, TE	+	CTX-M, <i>bla</i> _{TEM-1b} , <i>tet(B)</i>	FIA

AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico; FOX: Cefoxitina; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacina; GM: Gentamicina; NA: Ácido nalidíxico; CIP: Ciprofloxacino; LVX: Levofloxacino; C: Cloranfenicol; TE: Tetraciclina.

DISCUSIÓN

La inocuidad de los alimentos es una prioridad de la Salud Pública (OMS, 2015); en este contexto, millones de personas en México y el mundo enferman y otras mueren a causa de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Uno de los contaminantes más frecuentes en alimentos de consumo humano, son los microorganismos asociados al propio alimento o adquiridos por contaminación cruzada durante el procesamiento de éste, o en la matanza de los animales destinados al consumo humano. Algunos microorganismos presentes en los alimentos como las enterobacterias pueden ser indicadores de riesgos potenciales para la salud.

Por otro lado, en la clínica veterinaria se usan numerosos antibióticos y en la industria ganadera se usan moléculas similares a éstos como promotores de crecimiento animal. En este sentido, el antibiótico o molécula con una estructura similar puede ejercer una presión de selección en la microbiota animal de aquellas bacterias que portan mecanismos de resistencia al antibiótico que está ejerciendo la presión. A su vez, estas bacterias pueden transmitir sus mecanismos de virulencia y/o resistencia a su descendencia o a otras bacterias de la misma especie o de otra especie por mecanismos de transferencia genética horizontal (conjugación, transducción y transformación) haciendo del problema de la resistencia antimicrobiana un problema mayor de Salud Pública, en todo el mundo.

Como se mencionó anteriormente, las bacterias son agentes biológicos contaminantes de los alimentos, comprometiendo la inocuidad de éstos. Entre los patógenos más comunes encontramos a *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Camplilobacter* y *Streptococcus*, además de algunos oportunistas como *Citrobacter*.

La leche es una parte importante en la dieta de los niños y algunos adultos debido a su alto valor nutricional. Sin embargo, es un excelente medio para el crecimiento de microorganismos (Jeppu *et al.*, 2015), por lo tanto la presencia de patógenos la convierte en un potencial transmisor de enfermedades. Muchas epidemias transmitidas por la leche en humanos se han documentado, debido a la contaminación de ésta por las manos sucias de los trabajadores en la ordeña o pasteurización, por el uso de utensilios insalubres, por las moscas y los suministros de aguas contaminadas (Jeppu *et al.*, 2015). Por otro lado, la pasteurización no puede garantizar la ausencia de microorganismos cuando la carga

bacteriana en la leche cruda es muy alta. Además puede sufrir una contaminación después del proceso de pasteurización. En el presente estudio, se trabajó con muestras de leche crudas de diferentes municipios de Puebla, a pesar de que se realizó limpieza de las ubres y se tomó la muestra en recipientes estériles, se demostró la presencia de cepas de *E. coli* que fueron recuperadas para estudios fenotípicos y genotípicos de susceptibilidad a diferentes antimicrobianos. Como se mencionó anteriormente, las muestras de leche pudieron haberse contaminado durante la manipulación de las muestras, por materia fecal del mismo animal y en algunos casos por la propia mastitis que cursaba el animal o alguna causa ajena al muestreo.

El estudio filogenético de las cepas de *E. coli* aisladas de leche demostró la presencia principalmente de filogrupos A (25%) y B1 (25%), estos datos concuerdan con el origen de las cepas ya que estos dos filogrupos se asocian principalmente a cepas ambientales, comensales y poco virulentas. Por otro lado, a pesar de no encontrar cepas del filogrupo B2 que se asocia a cepas causante de infecciones extraintestinales, se identificaron los filogrupos D y F que están filogenéticamente relacionadas con el filogrupo B2 (Jaureguy *et al.*, 2008). En general las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales conocidas como ExPEC pertenecen al filogrupo B2 y en menor medida al filogrupo D y F. ExPEC se caracteriza por la presencia de factores de virulencia como adhesinas, cápsula, citotoxinas y sideróforos. Estos resultados sugieren un riesgo potencial en los productos lácteos crudos ya que aunque no se consuma la leche cruda, ésta puede servir de transporte de bacterias y transmitirlas a otros alimentos por contaminación cruzada destinados al consumo humano.

E. coli es uno de los microorganismos mejor estudiados en el tema de la resistencia antimicrobiana y existen diversos estudios donde se ha demostrado la diversidad enorme de mecanismos de resistencia en esta bacteria (Bajaj *et al.*, 2016). El fenotipo de resistencia a los antimicrobianos evaluados en las cepas de *E. coli* evidenció una alta frecuencia de resistencia principalmente a los antibióticos β -lactámicos como se ha demostrado en otros trabajos (Torres, 2007). Debido a que por lo general la resistencia a antibióticos β -lactámicos va unida a la resistencia a quinolonas, en este trabajo también se estudió la resistencia a estos antibióticos, buscando mecanismos cromosómicos y plasmídicos involucrados.

En las cepas de *E. coli* aisladas de leche cruda, se observó una alta prevalencia de CTX-M-79, la cual está estrechamente relacionada con CTX-M-15 (Cantón y Coque., 2006) que no fue identificada en ninguna cepa de *E. coli* estudiada en este trabajo, a diferencia de otros

estudios (Rocha-Gracia *et al.*, 2015; Silva-Sánchez *et al.*, 2013). La BLEE CTX-M-15 constituye la BLEE más ampliamente distribuida alrededor del mundo (Lahlaoui *et al.*, 2014) así como la CTX-M-14, lo que sugiere que el fenotipo alélico podría estar cambiando por mutaciones puntuales en CTX-M15. Por otro lado, este trabajo constituye la primera evidencia en México de la presencia de CTX-M-79 y CTX-M-28 en cepas de *E. coli* aisladas de leche. Además de CTX-M-79 y -28, fue identificado en la cepa BUAP280 la BLEE CTX-M-27. Al igual que CTX-M-15, la importancia de las variantes CTX-M-79, CTX-M-28 y CTX-M-27, radica en poseer una sola sustitución de aminoácido de Asp (D) a Gly (G) en la posición 240 en la numeración de Ambler (Ambler *et al.*, 1980), lo cual incrementa su actividad frente a ceftazidima incrementando la CMI a éste antibiótico, además de conferir resistencia cefotaxima (Kiratisin *et al.*, 2007).

Algunas CTX-M son consideradas específicas de algunos países (tales como CTX-M-9 y CTX-M-14 en España, CTX-M-1 en Italia o CTX-M-2 en Sudamérica y Japón) (Lahlaoui, 2014); sin embargo, en éste trabajo también fue identificada CTX-M-1 lo cual sugiere su amplia distribución alrededor del mundo en países como México.

TEM-1 es la β -lactamasa mediada por plásmidos más común que confiere resistencia a ampicilina en bacterias *E. coli* (Livermore, 1995). TEM-1 no es una BLEE; sin embargo, se han descrito previamente β -lactamasas TEM resistentes a inhibidores (IRT) (Belaouaj *et al.*, 1994) los cuales difieren en la secuencia de nucleótidos en diferentes posiciones que no afecta la secuencia aminoacídica pero confieren resistencia a los inhibidores de β -lactamasas. En éste trabajo fueron identificadas las IRT TEM-1b por el cambio de GGC/GGT en la posición 436 y GCG/GCT en la posición 604 de la secuencia nucleotídica en todos los amplificadores de TEM.

Basados en el fenotipo de resistencia a quinolonas se buscó la presencia de genes plasmídicos involucrados en la resistencia hacia este grupo de antibióticos, sin embargo no se identificó ninguno. No obstante, se identificaron mecanismos cromosómicos que involucran mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas en GyrA y ParC que aumentan los niveles de la CMI a ciprofloxacino entre otros. La prevalencia de estas mutaciones es reportada con frecuencia (Poirel *et al.*, 2010; Silva-Sánchez *et al.*, 2013) y es uno de los principales mecanismos de resistencia a quinolonas. Las quinolonas son el segundo grupo de antibióticos más ampliamente utilizados en la práctica clínica y la presencia de resistencia cromosómica limita aún más el tratamiento en infecciones con este tipo de cepas. Estos resultados sugieren que el uso indiscriminado de la quinolonas ha ejercido una presión de selección de cepas con mutaciones cromosómicas

(encontradas en todas las cepas de *E. coli*) en GyrA y ParC que en el futuro restringirán por completo el uso de las quinolonas como opción terapéutica.

Los aminoglucósidos constituyen un grupo importante de antibióticos en la práctica clínica. Desgraciadamente su eficacia se ha reducido por la aparición de cepas resistentes a estos antibióticos. El mecanismo más común es la modificación enzimática del aminoglucósido, encontrando en primer lugar la enzima *aac(3)-II*, seguida de *aac(6')-I*, *ant(3'')-I*, *aph(3')-II*, y *ant(2'')-I* en cepas de *E. coli* (Hu *et al.*, 2013). Los aislados de *E. coli* estudiados en éste trabajo, fueron resistentes a gentamicina pero no a amikacina. Como en estudios previos en otros países (Xiao y Hu., 2012) la enzima modificadora de aminoglucósidos identificada en éste estudio fue *aac(3)-II*, lo cual sugiere que probablemente esta enzima se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo.

También se estudió en las cepas de *E. coli* aisladas de leche la prevalencia de proteínas Tet (A) y (B) que se asocian al fenotipo de resistencia hacia tetraciclina, ya que como se mencionó anteriormente, las tetraciclinas y clortetraciclinas son de los antibióticos más usados en veterinaria, observando una prevalencia alta de proteínas Tet (A) y Tet(B).

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos, además de limitar las alternativas en la terapia antibacteriana, pueden seleccionar clonas patógenas como los patotipos de *E. coli*. En éste contexto, se buscaron los patotipos diarregénicos de *E. coli*, encontrando una cepa EPEC atípica (BUAP94Ec). La cepa BUAP94Ec, porta la BLEE CTX-M-28, la β -lactamasa TEM-1 y la proteína Tet(A) los cuales limitan su tratamiento y favorecen su selección en el entorno ambiental. CTX-M-28 es una BLEE que hidroliza cefalosporinas de amplio espectro, es inhibida por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, está estrechamente relacionada con CTX-M-15 difiriendo por un cambio de Asp a Asn en la posición 288. Ésta enzima confiere altos niveles de resistencia a cefotaxima y muestra bajos niveles de actividad frente a ceftazidima (Bonnet, 2004). Además, se ha reportado la presencia de esta enzima en un plásmido de 50 kb que es transferible por conjugación, facilitando su diseminación hacia otras bacterias (Ben *et al.*, 2008). Por lo tanto, si esta cepa llegara una persona susceptible, podría causar la enfermedad y persistir ya que sus diversos mecanismos de resistencia representan una ventaja evolutiva frente a otras bacterias.

EPEC atípica tiene como hospedero al humano además de otros animales (Trabulsi *et al.*, 2002), lo cual concuerda con el origen de las muestras. Las cepas de EPEC atípica frecuentemente expresan la toxina termoestable EAST1 y otros factores de virulencia potenciales no codificados en la región LEE, en este sentido, hay dos tipos de cepas, las

que expresan los factores de virulencia LEE y las que además de los LEE, expresan otros factores de virulencia no LEE. Hasta ahora todos los serotipos de cepas atípicas de EPEC muestran el patrón de adherencia agregativa y la región LEE. Por último, las cepas de EPEC atípica están más estrechamente relacionados con la *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y ambas se consideran patógenos emergentes.

En bacterias Gram negativas, la diseminación de la resistencia se ha atribuido al intercambio inter- e intra-específico del ADN bacteriano, mediante la transferencia horizontal de genes de resistencia localizados en plásmidos causando infecciones adquiridas comunitarias u hospitalaria (Carattoli, 2013). Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que pueden conferir resistencia a muchos antibióticos, incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas, macrólidos y trimetoprim. En éste contexto se han secuenciado numerosos plásmidos (en su mayoría de *E. coli*) los cuales son portadores de numerosos genes de resistencia.

A la fecha, la mejor manera de clasificar plásmidos es mediante su grupo de incompatibilidad. Estos grupos de incompatibilidad frecuentemente son asociados a determinantes de resistencia y a la viabilidad del plásmido a ser transferido por conjugación. Por ejemplo, los grupos IncF e IncN se asocian frecuentemente a CTX-M y los plásmidos de replicación por círculo rodante frecuentemente son asociados a las proteínas QnrB (Carattoli, 2013). En nuestro estudio, fueron identificados plásmidos del grupo IncF, específicamente los alelos FIA y FIB. Los plásmidos InF frecuentemente portan genes de resistencia y el más frecuente es CTX-M-15 y también se han asociado a la serín carbapenemasa KPC (Carattoli, 2011). Sin embargo, en nuestro estudio no se identificó la presencia de CTX-M-15 sino de CTX-M-79, pero, la relación filogenética de ambas enzimas es muy estrecha lo cual sugiere que CTX-79 pudiera estar presente también en plásmidos F. También fue identificada la presencia del grupo Inc1 en 5 cepas incluyendo la cepa BUAP94Ec (EPEC atípica). Inc1 se caracteriza por codificar un cluster parecido al pili tipo IV que contribuye a la invasión y adhesión de *E. coli* Shiga-toxigénico (STEC) (Kim y Konamo, 1997) lo que lo convierte en un factor de virulencia importante y en las cepas donde se identificó éste plásmido y junto con los determinantes de resistencia identificados en las cepas mencionadas anteriormente, podrían potenciar su diseminación. Leverstein-van y colaboradores, demostraron que el plásmido Inc1 en cepas de *E. coli* y *Salmonella* aisladas de animales destinados al consumo humano y muestras humanas en diferentes países Europeos, son capaces de difundirse fácilmente y podrían tener un reservorio importante en la cadena alimentaria (Leverstein-van *et al.*, 2011; Carattoli, 2011).

Citrobacter spp.

El género *Citrobacter* está de manera ubicua en muchos ambientes, por ejemplo agua, suelo, alimentos y el tracto gastrointestinal de los humanos (Metri *et al*, 2013). En los últimos años se ha incrementado la frecuencia de éste microorganismo en infecciones del tracto urinario (ITU) hasta en un 12% y es bien sabido que es agente causal de infecciones neonatales. En éste contexto, la amoxicilina y la ampicilina son los antibióticos más usados en las ITU causadas por bacterias Gram negativas, incluyendo el género *Citrobacter*. El presente estudio se enfocó en el estudio de cepas aisladas de alimentos, sin embargo, debido a la baja prevalencia del género *Citrobacter* en las muestras de alimentos analizadas se caracterizaron también muestras clínicas y de portadores.

Es importante resaltar la heterogeneidad genotípica de la resistencia a los diferentes antibióticos evaluados en éste trabajo en las cepas de *Citrobacter* spp. De los tres tipos de muestras (alimentarias, portadores y clínicas), se esperaba que las cepas clínicas mostraran un arsenal completo de diversos mecanismos de resistencia como se ha demostrado en estudios previos (Kanamori *et al*, 2011; Poirel *et al*, 2011) donde se demostró la presencia de BLEE como CTX-M, TEM y SHV e incluso la presencia de la metalo- β -lactamasa NDM-1 así como OXA-1 entre otras. Sin embargo, en las cepas clínicas de éste trabajo, solo fue identificada CMY y en la cepa BUAPA10Cy QnrB10 como en un estudio previo (Pan *et al.*, 2010). Resulta interesante que las cinco cepas de origen clínico mostraron resistencia a los β -lactámicos ceftazidima, cefotaxima y piperacilina además del aminoglucósido gentamicina y la quinolona ciprofloxacino y solo se encontró CMY. Ésta resistencia observada y la ausencia de posibles genes responsables del fenotipo de resistencia podría explicarse por la presencia de algún otro mecanismo no buscado en estas cepas como puede ser la sobreexpresión de bombas de eflujo o modificación de la permeabilidad de la membrana e incluso una sobreexpresión de AmpC y un sinergismo con CMY. El comportamiento genotípico de las cepas de portadores fue similar al de las cepas clínicas; sin embargo, el comportamiento fenotípico fue diferente, encontrando menos resistencia a los antibióticos evaluados. Éstos resultados apoyan el fundamento de la presión de selección, ya que las cepas clínicas al estar más expuestas a diversos antibióticos muestran resistencia a diferentes familias de antibióticos a diferencia de las cepas de portadores que se encuentran expuestas a una menor diversidad de antibióticos. Por último, las cepas aisladas de alimentos mostraron un genotipo más variado que las anteriores, encontrando BLEE como CTX-M, TEM-1 y SHV además de TET (A/B) y *aac(3')*-II,

estos resultados concuerdan con los reportados previamente por Ben Said y colaboradores en 2015. La presencia de Tet(A) y Tet(B) en las cepas de alimentos, podría deberse a que la tetraciclina es ampliamente usada en la práctica veterinaria (tomando en cuenta que estas cepas fueron aisladas de carne de pollo) favoreciendo la selección de bacterias portadoras de estos genes.

La presencia de la β -lactamasa AmpC cromosómica e inducible en el género *Citrobacter* confiere resistencia innata a ampicilina y amoxicilina además de cefalotina, cefoxitina, cefotetan, ceftriaxona y amoxicilina-ácido clavulánico (Martínez-Rojas, 2009). En éste contexto, por PCR se evidenció la presencia de CMY, una β -lactamasa tipo AmpC en 13 de los 14 aislados, la cual probablemente confiera un sinergismo junto con AmpC que se ve reflejado en la resistencia fenotípica observada a los antibióticos piperacilina, ceftazidima y en algunos casos hacia cefotaxima que comúnmente son hidrolizados por BLEE como CTX-M. Además, por secuenciación, en la cepa BUAP385Cf se evidenció la presencia de un nuevo alelo de CMY designado como CMY-144.

El estudio filogenético de CMY-144 y 95 variantes de CMY mostró una relación filogenética de CMY-144 con CMY-26 (AB300358) y CMY-37 (AB280919). CMY-26 fue identificado en una cepa de *K. oxytoca* aislada de las heces de un ave en un zoológico en Japón y presenta una homología del 98% con CMY-13 (Ahmed *et al.*, 2007). CMY-37 fue identificada en una cepa de *C. freundii* aislada en 2006 en un paciente Palestino con ITU; ésta enzima presenta un fenotipo singular, pues hidroliza cefepime y cefpiroma, cefalosporinas de cuarta generación que generalmente no son hidrolizadas por β -lactamasa tipo AmpC. CMY-37 también presenta una alta homología con CMY-13 (Ahmed y Shimamoto, 2008). CMY-144 presenta una homología del 97.90% con CMY-26 y 97.11% con CMY-37 y 98.16% con CMY-13.

El entrono genético de CMY-144 (*frdB/C/D-ampR-cmy-144-blc-sugE*) es similar al de CMY-13 (Miriagou *et al.*, 2004). Sin embargo, no fue identificado en el entorno genético de CMY-144 la secuencia de inserción 26 (IS26) duplicada flanqueando el segmento antes mencionado (transposón compuesto) presente en el entorno genético de la CMY-13. No obstante, por PCR fue amplificada la IS26 en la cepa BUAP385Cf, lo cual no descarta la posibilidad de que exista la secuencia IS26 en algún sitio y que esto permita en un momento determinado y bajo las condiciones adecuadas movilizar el alelo CMY-144 identificado en esta cepa.

Para el estudio plasmídico, se realizaron ensayos para 16 replicones (Carattoli, 2005); sin embargo, no se pudo identificar ningún grupo de incompatibilidad en los plásmidos de *Citrobacter* spp., por eso se estudió la presencia de las familias MOB (Alvarado *et al.*, 2012). El método de Carattoli permite la identificación de 16 de los 27 grupos de incompatibilidad hasta ahora identificados en enterobacterias. Por otro lado, la clasificación por tipos MOB [dominio MOB (Mobility) de la relaxasa] puede cubrir casi la totalidad de plásmidos microbianos, además los plásmidos raramente llevan más de un gen de relaxasa.

Resulta interesante la presencia de las familias MOB en los plásmidos de las cepas de *Citrobacter*. MOB_{P5} fue identificado por PCR en la cepa BUAP395Cf aislada de carne de pollo. Esta subfamilia MOB está relacionado con el grupo Inc ColE1 que son plásmidos movilizables y es la subfamilia MOB más ampliamente distribuida (Smillie *et al.*, 2010), además MOB_P está relacionada con plásmidos de diferentes tamaños mientras que MOB_F y MOB_H se relacionan principalmente con plásmidos grandes. Por otro lado MOBC12 fue identificada en la cepa BUAP394Cf y BUAPA10Cy. Ésta subfamilia MOB se encuentra principalmente en plásmidos de tamaño medio (>50kb), son muy raros y además de que son movilizables codifican su propia proteína de acoplamiento tipo 4 (T4CP); por lo tanto si se considera que la conjugación tiene dos pasos: el primero el reconocimiento de la relaxosoma-T4CP y luego T4CP-SST4, entonces la composición genética del plásmido MOBC12 indica que tienen un amplio rango de ayudantes para la movilización, aunque este hecho aún no ha sido confirmado en la naturaleza (Smillie *et al.*, 2010). De ser comprobado, aunque este tipo de plásmidos no sean conjugativos, tienen más oportunidades de ser movilizados que otros plásmidos.

El problema de la resistencia antimicrobiana es un grave problema de Salud Pública mundial que involucra a México y es urgente el estudio de cepas ajenas al ambiente hospitalario para tratar de comprender la evolución del fenómeno de la resistencia antimicrobiana. Por otro lado, más estudios de este tipo son necesarios para mejorar la regulación de la inocuidad de productos alimentarios que a diario circulan por nuestro país. Según la OMS, 1 de cada 5 enfermedades causadas por bacterias resistentes son de origen alimentario o animal y se estima que las enfermedades transmitidas por los alimentos causa la muerte aproximadamente de 200 millones de personas en el mundo.

En general, el conjunto de éstos resultados en las cepas de *Citrobacter* spp., y *E. coli* muestran un arsenal amplio en cuanto a mecanismos de resistencia así como su potencial de diseminación intra- e inter-especie. Es por ello que es necesario seguir investigando la

frecuencia, la prevalencia y la aparición de nuevos mecanismos de resistencia antimicrobiana principalmente en México donde la información en la literatura de éste problema de Salud Pública es escasa. Los resultados sugieren además que la cadena alimenticia constituye un excelente medio para la diseminación de cepas multidrogoresistentes que en algún momento determinado y bajo las condiciones óptimas pudieran causar daño a hospederos susceptibles.

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Citrobacter* spp., y *E. coli*, son portadoras de numerosos mecanismos de resistencia antimicrobiana
- La cepa BUAP94Ec es una EPEC atípica, patovar diarreagénico.

- Este trabajo constituye el primer reporte de CTX-M-79 en cepas de *E. coli* aisladas de leche cruda de vaca en México.
- CTX-M-79 fue la BLEE más prevalente en las cepas de *E. coli*, mientras que en las cepas de *Citrobacter* spp., la b-lactamasa más prevalente fue CMY.
- Se evidenció una alta prevalencia (100%) de CTX-M en las cepas de *E. coli* aisladas de leche, lo cual representa un grave problema en la diseminación de esta BLEE en cepas ambientales.
- La presencia en más de la mitad (56%) de las cepas de *E. coli* del ITR TEM-1b indica una prevalencia moderada de esta β -lactamasa que limita el tratamiento con ampicilina y los inhibidores de β -lactamasa.
- Se identificaron mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas en las cepas de *E. coli* y *Citrobacter* spp.
- En las cepas de *E. coli*, se identificaron los replicones IncF, IncI1-g y IncB/O. Y en las cepas de *Citrobacter* spp (BUAP395Cf y BUAPA10Cy) las familias MOB P51 y C12.
- No se identificaron genes BLEE en las cepas clínicas y portadores de *Citrobacter* spp.,
- Este trabajo constituye el primer reporte de CMY-144.
- Se demostró la resistencia intermedia a imipenem por CMI, pero, no se identificó IMP, KPC o GES.
- Se identificó la proteína Qnr en 5 cepas de *Citrobacter* spp. (BUAP362Cf, BUAP385Cf, BUAP395Cf, BUAP400Cf y BUAPA10Cy).
- La presencia de proteínas Tet en las cepas de alimentos tanto de *E. coli* como de *C. freundii* sugieren una alta presión de selección por tetraciclina en el ambiente, especialmente en la ganadería.
- La presencia de subfamilias MOB (P, H, C12) en algunos plásmidos de las cepas de *Citrobacter* spp. sugieren que si bien no son conjugativos, si son movilizables y

éstos podrían portar alguno de los mecanismos de resistencia observado en estas cepas.

PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos de conjugación en las cepas de *E. coli* y *Citrobacter* spp., para conocer el potencial de diseminación de los mecanismos de resistencia evidenciados en algunas cepas.
- Realizar estudios de porinas y sobreexpresión de bombas en las cepas de *Citrobacter* spp. con resistencia intermedia a imipenem para identificar el mecanismo involucrado en este fenotipo.

- Clonar el nuevo alelo de CMY de la cepa BUAP385Cf para saber su espectro de hidrólisis y realizar la caracterización enzimática.
- Secuenciar el amplificado de CMY junto con su entorno genético en las cepas de *Citrobacter spp.*, que amplificaron este fragmento para conocer la variante de CMY y su entorno, ya que pudiera haber otras variantes nuevas.
- Secuenciar y determinar el entorno genético de las cepas de *Citrobacter spp.*, que tienen CMY pero no el mismo entorno genético a las anteriores.
- Clasificar los plásmidos de *E. coli* por subfamilias MOB para tener una idea más clara sobre el comportamiento de estos plásmidos.
- Realizar la búsqueda de otros elementos móviles como integrones para conocer el potencial de diseminación en los aislados recuperados en este trabajo.
- Realizar la búsqueda de otros mecanismos de resistencia que puedan explicar la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en las cepas de *Citrobacter spp.* de origen clínico.

REFERENCIAS

- Ageron, E., & Riddle, C. F. (1993). Classification of Citrobacteria by DNA Hybridization. *43(4)*, 645–658.
- Agersø S and Sandvang D. (2005). Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in *Alcaligenes, Arthrobacter, and Pseudomonas spp.* Isolated from Pigsties and Manured . *Applied and environmental microbiology*, Dec. p. 7941–7947
doi:10.1128/aem.71.12.7941–7947.2005

- Ahmed, A. M., & Shimamoto, T. (2008). Emergence of a cefepime- and ceftazidime-resistant *Citrobacter freundii* clinical isolate harbouring a novel chromosomally encoded AmpC β -lactamase, CMY-37. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(3), 256–261. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.04.019>
- Ahmed, A. M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y., & Shimamoto, T. (2007). Zoo animals as reservoirs of Gram negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6686–6690. <http://doi.org/10.1128/AEM.01054-07>
- Akpaka P., Swanston W., Ihemere H., Correa A., Torres J., Tafur J. (2009). Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol*. 47(8): 2670–2671. doi: 10.1128/JCM.00362-09
- Alós, J I. 2003. Quinolonas. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 21(5):261-8. <http://doi.org/10.1130/AEM.01584-09>
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS ONE*, 7(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>
- Alvarez A. (2010). Identificación de beta-lactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Rev haban cienc méd.* 9: 516-524.
- Ambler RP. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289: 321–31.
- Arenas-Hernández MA., Martínez-Laguna Y. and Alfredo G. Torres. (2012). Clinical Implications of Enteroadherent *Escherichia coli*. *Curr Gastroenterol Rep.* 10.1007/s11894-012-0277-1
- Bajaj, P., Singh, N. S., & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli* β -lactamases: What really matters. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00417>
- Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Langrange, P. H., Philippon, A.(1998). *Salmonella enteritidis* AmpC plasmid mediated inducible - β - lactamases (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2352–8.

- Batchelor M., Hopkins J., Threlfall, Clifton-Hadley F., D. Stallwood,. (2005). blaCTX-M Genes in Clinical *Salmonella* Isolates Recovered from Humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005. 49(4): 1319–1322. doi: 10.1128/AAC.49.4.1319-1322.2005
- Bauernfeind A., Grimm H., Schweighart S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*.18: 294-8.
- Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Caniça, M. M., Vedel, G., Nénot, P., Krishnamoorthy, R., & Paul, G. (1994). Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiology Letters*, 120(1–2), 75–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8056297>
- Ben Achour, N., Mercuri, P. S., Power, P., Belhadj, C., Ben Moussa, M., Galleni, M., & Belhadj, O. (2009). First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. *Pathologie Biologie*, 57(5), 343–348. <http://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.07.016>
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., ... Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 86–92. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023>
- Bertrand, S., Weill, F.-X., Cloeckaert, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., ... Collard, J.-M. (2006). Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M- 2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2897–903.
- Blackwood R K. Determinación de la estructura y la síntesis total de las tetraciclinas. Hlávka JJ, Boothe JH, editores. Manual de farmacología experimental. Vol. 78. Berlín, Alemania: Springer-Verlag KG; 1985. pp. 59-136
- Bonnet R. (2004). Growing group of extended spectrum: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agent Chemother*, 48(1), 1–14. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1>

- Bontron, S., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). In vitro prediction of the evolution of GES-1 β -lactamase hydrolytic activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), 1664–1670. <http://doi.org/10.1128/AAC.04450-14>
- Bradford PA. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14: 933- 51.
- Brenner DJ, Grimont PA, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E, Riddle CF. (1993). Classification of citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.*(4):645–658
- Briñas L. et al. (2005). Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 56:1107-1110.
- Bush, K. and Singer, S. B. (1989). Biochemical characteristics of extended broad spectrum β -lactamases. *Infection* 17:429–433.
- Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233.
- Cantón R. (2008). Epidemiology and evolution of betalactamases. En: Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutiérrez-Fuentes JA (eds). ASM Press, Washington D.C. pp. 249-270.
- Cantón, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 466–475. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <http://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 654–658. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.003>

- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 298–304. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219–228. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>
- Cattoir V., Poirel L., and Nordmann P. (2008). Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Pump QepA2 in an *Escherichia coli* Isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3801-3804.
- Cejas, D., Almuzara, M., Santella, G., Tuduri, A., Palombarani, S., Figueroa, S. Radice, M. (2008). Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(4), 238–245.
- Chopra I, Hawkey P M, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother.* 1992;29:245–277
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <http://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., & Bonacorsi, P. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>.Updated
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <http://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>

- CLSI. (2014) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighteenth Informational supplement. CLSI document M100-S18. Wayne. PA. Clinical and Laboratory Standards Institute;
- Coque TM, Willems R, Cantón R, Del Campo R, Baquero F. (2002). High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Dec;50(6):1035-8.
- Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Torres C, Castañeda M, Sánchez GM, Alonso CA, López-Pliego L, Mayen MG, Martínez-Laguna Y, Rocha-Gracia Rdel C. (2016). Detection and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Producers of Extended-Spectrum and CMY-2 Type Beta-Lactamases, Isolated from Turtles in Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* doi: 10.1089/vbz.2014.1725.
- Coudron PE. (2005). Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 43(8):4163-7.
- Croxen, M. a, & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews. Microbiology,* 8(1), 26–38. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 47(8), 2565–2571. <http://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003>
- Garza-Ramos, U., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Tamayo-Legorreta, E., Catalan-Najera, J. C., Morfin-Otero, R., Silva-Sanchez, J. (2015). Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: A multicenter study in Mexican hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,* 81(2), 135–137. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.029>
- Gómez-Duarte OG, Arzuza O, Urbina D, Bai J, Guerra J, Montes O, Puello M, Mendoza K, Castro GY. (2010). Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. *Foodborne Pathog Dis.* 7(2):199-206. doi: 10.1089/fpd.2009.0355.
- Holmes, B., & Aucken, H. M. (1998). *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia* and other members of the *Enterobacteriaceae*. In L. Collier, A. Balows & M. Sussman

(Eds.), *Microbiology and Microbial infections: Systematic Bacteriology* (9th ed., pp. 999-1033). London: Arnold.

Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182. <http://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>

Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Thiagarajan, M. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9(1), 560. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>

Kanamori, H., Yano, H., Hirakata, Y., Endo, S., Arai, K., Ogawa, M., Kaku, M. (2011). High prevalence of extended-spectrum β -lactamases and qnr determinants in *Citrobacter* species from Japan: Dissemination of CTX-M-2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2255–2262. <http://doi.org/10.1093/jac/dkr283>

Kerstens, K., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. *The Prokaryotes*, Springer, New York.

Kim, H. B., Park C. H., Kim E. C., Jacoby G. A. Hooper D. C. 2009. oqxAB Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3582–3584

Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Saifon, P., Laesripa, C., Kitphati, R., & Mundy, L. M. (2007). The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum β -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(3), 349–355. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.02.005>

Knirel, Y. A., Kocharova, N. A., Bystrova, O. V., Katzenellenbogen, E., & Gamian, A. (2002). Structures and serology of the O-specific polysaccharides of bacteria of the genus *Citrobacter*. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*. 50:379- 391.

Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 11: 315-7.

Kollek R, Oertel W, Goebel W. (1978). Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1. *Mol Gen Genet*. 162(1):51-7.

- Koovapra, S., Bandyopadhyay, S., Das, G., Bhattacharyya, D., Banerjee, J., Mahanti, A., Singh, R. K. (2016). Molecular signature of extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine milk in eastern and north-eastern India. *Infection, Genetics and Evolution*, 44, 395–402. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.032>
- Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., & Ben Moussa, M. (2014). Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Medecine et Maladies Infectieuses*, 44(9), 400–404. <http://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.03.010>
- Lescat M1, Clermont O, Woerther PL, Glodt J, Dion S, Skurnik D, Djossou F, Dupont C, Perroz G, Picard B, Catzeflis F, Andremont A, Denamur E. (2012). Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environ Microbiol Rep*.5 (1):49-57. doi: 10.1111/j.1758-2229.2012.00374.x.
- Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munckhof, M. P., van Essen-Zandbergen, A., Mevius, D. J. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(6), 873–880. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x>
- Livermore, D. M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665470> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC172876>
- Lupo, A., Papp-Wallace, K. M., Sendi, P., Bonomo, R. A., & Endimiani, A. (2013). Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 179–194. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.001>
- Mac Faddin, Jean F. (2003). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Buenos Aires; México, D.F. Médica Panamericana.

- Martínez Rojas, D. D. V. (2009). Artículo de revisión Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 78–83.
- Martínez-Martínez L, Eliecer Cano M, Manuel Rodríguez-Martínez J, Calvo J, Pascual A. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 6(5):685-711. Review.
- Martins, M. T., Rivera, I. G., Clark, D. L., Stewart, M. H., Wolfe, R. L., & Olson, B. H. (1993). Distribution of uidA gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2271–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Metri BC Jyothi P, Peerapur BV. (2013). Antibiotic resistance in *Citrobacter* spp. isolated from urinary tract infection. *Urol Ann*. 5(4):312-3. doi: 10.4103/0974-7796.120295.
- Miriagou, V., Tzouvelekis, L. S., Villa, L., Lebessi, E., Vatopoulos, A. C., Carattoli, A., & Tzelepi, E. (2004). CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 3172–3174. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3172-3174.2004>
- Nataro, J., & Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11(1), 142–201.
- Oram M, Fisher LM. (1991). Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Feb;35(2):387-9.
- Pan, J., Hu, L., Yu, F., Chen, C., & Zhang, X. (2010). Coexistence of multiple antimicrobial-resistance genes in a carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* clinical isolate from China. *Journal of Medical Microbiology*, 59(5), 622–623. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.016287-0>
- Panchalingam, S., Antonio, M., Hossain, A., Mandomando, I., Ochieng, B., Oundo, J., Nataro, J. P. (2012). Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control

- study. *Clinical Infectious Diseases*, 55(SUPPL. 4), 294–302. <http://doi.org/10.1093/cid/cis754>
- Park M, Deck J, Foley SL, Nayak R, Songer JG, Seibel JR, Khan SA, Rooney AP, Hecht DW, Rafii F. (2006). Diversity of *Clostridium perfringens* isolates from various sources and prevalence of conjugative plasmids. *Anaerobe*. 38:25-35. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.11.003.
- Paterson, DL., Bonomo, RA. (2005). Extended-spectrum betalactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 18: 657-86.
- Petrella, S., M. Renard, N. Ziental-Gelus, D. Clermont, V. Jarlier, and W.Sougakoff. (2006). Characterization of the chromosomal class A beta-lactamase CKO from *Citrobacter koseri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 254:285–292.
- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-Determined AmpC-Type-Beta-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 1–11. <http://doi.org/10.1128/AAC.46.1.1>
- Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. (1998). beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jun;42(6):1350-4.
- Poirel L, Hombrouck-Alet C, Freneaux C, Bernabeu S, Nordmann P. (2010). Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect Dis*. 10(12):832. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70279-6.
- Poirel, L., Ros, A., Carricajo, A., Berthelot, P., Pozzetto, B., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2011). Extremely drug-resistant *citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 447–448. <http://doi.org/10.1128/AAC.01305-10>
- Porres-Osante, N., Saenz, Y., Somalo, S., & Torres, C. (2015). Characterization of Beta-lactamases in Faecal *Enterobacteriaceae* Recovered from Healthy Humans in Spain: Focusing on AmpC Polymorphisms. *Microbial Ecology*, 4(1), 132–140. <http://doi.org/10.1007/s00248-014-0544-9>
- Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper, D.C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*. 6:629-40.

- Rocha-Gracia, R. C., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Bello, F., Martínez-Laguna, Y., & Torres, C. (2015). Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases. *Veterinary Journal*, 203(3), 315–319. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.026>
- Rodríguez-Martínez, J. M. (2005). Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 23, 25–31. <http://doi.org/10.1157/13070406>
- Ruiz, E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., & Torres, C. (2012). Qnr, aac(6′)-ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: Genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 886–897. <http://doi.org/10.1093/jac/dkr548>
- Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(10):3996-4001.
- Schroeder GN1, Hilbi H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev*. 21(1):134-56. doi: 10.1128/CMR.00032-07
- Shahid, M. (2010). *Citrobacter* spp. simultaneously harboring blaCTX-M, bla TEM, blaSHV, blaampC, and insertion sequences IS26 and orf513: An evolutionary phenomenon of recent concern for antibiotic resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1833–1838. <http://doi.org/10.1128/JCM.01467-09>
- Shao, Y., Xiong, Z., Li, X., Hu, L., Shen, J., Li, T., Chen, S. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Citrobacter freundii* isolates from Anhui province, PR China. *Journal of Medical Microbiology*, 60(12), 1801–1805. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.034082-0>
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
- Silva-Sánchez, J., Cruz-Trujillo, E., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Garza-Ramos, U., Garza, E. (2013). Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone

- Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Pediatric Clinical Isolates in Mexico. *PLoS ONE*, 8(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077968>
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V, Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3), 434–452. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. (1988). Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis*. 10(4):879-84.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., & Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 664–689. <http://doi.org/10.1128/CMR.00016-09>
- Suárez C. and Gudíol F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 27(2):116–129
- Tafur, D., & Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación colombiana de infectología*. 12(3): 217-226
- Thomas CM, Nielsen KM. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 3(9):711-21. Review.
- Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR. (2003). Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 52(4):583-90.
- Torres, C., Bioquímica, Á., Centro, M., Tecnológico, C., La, U. De, & Logroño, R. (2007). (BLEE): UN DESAFÍO EPIDEMIOLÓGICO Y TERAPÉUTICO BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29–37.
- Trabulsi, L. R., Keller, R., & Tardelli Gomes, T. A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8(5), 508–513. <http://doi.org/10.3201/eid0805.010385>

- Turner SM, Chaudhuri RR, Jiang ZD, DuPont H, Gyles C, Penn CW, Pallen MJ, Henderson IR. (2006). Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. *J Clin Microbiol.* 44(12):4528-36.
- Underwood, S., and M. B. Avison. (2004). *Citrobacter koseri* and *Citrobacter amalonaticus* isolates carry highly divergent beta-lactamase genes despite having high levels of biochemical similarity and 16S rRNA sequence homology. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:1076–1080.
- Vila J, Ruiz J, Goñi P, De Anta MT. (1996). Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(2):491-3.
- Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos A, Jimenez de Anta T. (1995). Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(5):1201-3.
- Wang D, Wang H, Qi Y, Liang Y, Zhang J, Yu L. (2008). Novel variants of the qnrB gene, qnrB31 and qnrB32, in *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 60(Pt 12):1849-52. doi: 10.1099/jmm.0.034272-0.
- www.lahey.org/studies. Lahey Clinic. 2011. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes.
- Xiao, Y., & Hu, Y. (2012). The major aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-II found in *Escherichia coli* determines a significant disparity in its resistance to gentamicin and amikacin in China. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 18(1), 42–6. <http://doi.org/10.1089/mdr.2010.0190>