



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS



POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESISTENCIA Y
VIRULENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli*
PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE
ESPECTRO EXTENDIDO AISLADAS DE
VEGETALES CRUDOS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

Q.B.P. EDER ALEJANDRO CARREÓN LEÓN

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

PUEBLA, PUE.

NOVIEMBRE, 2019



BUAP

Puebla, Pue. a 1 de julio 2019.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Eder Alejandro Carreón León**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

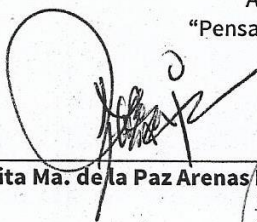
“Estudio molecular de la resistencia y virulencia de cepas aisladas de *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de vegetales crudos”

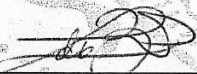
A nuestro juicio, el alumno **Eder Alejandro Carreón León** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

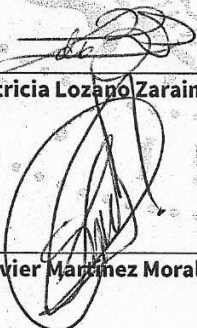
Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

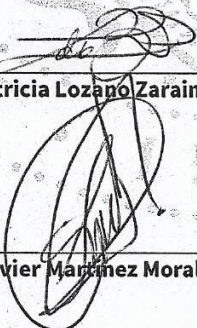
Atentamente.

“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández


D.C. Patricia Lozano Zarain


D.C. César González Bonilla


D.C. Luis Javier Martínez Morales



Puebla, Pue., a 1 de julio 2019.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.

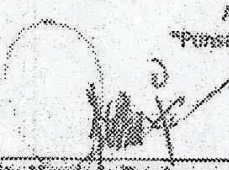
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno Eder Alejandro Carreón León, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Estudio molecular de la resistencia y virulencia de cepas aisladas de *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de vegetales crudos"

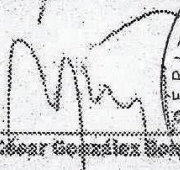
A nuestro juicio, el alumno Eder Alejandro Carreón León puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

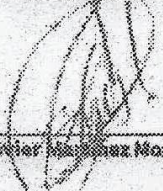
Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández


D.C. Patricia Lozano Zarain


D.C. César González Bonilla


D.C. Luis Javier Martínez Morales



Registrado en Cancún, Quintana Roo
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio K11,
Cualquier hora
Paseo de la Libertad, Puebla, Pue. CP 72570
Tel. (222) 229-70-00 Ext. 2022
www.buap.mx

Agradecimientos

◆ INSTITUCIONALES

- A la **Universidad Autónoma de Chihuahua**, mi alma mater, por todo el apoyo recibido y por permitirme superarme académicamente para fortalecer la planta académica y de investigación. Luchar para lograr, Lograr para dar.
- A la **Facultad de Ciencias Químicas de la UACH** y al **Laboratorio de Análisis Clínicos de la UACH**, en particular al Dr. Pedro Javier Martínez Ramos y al M.A. Oscar René Valdez Domínguez, por el apoyo dado para poder ausentarme durante el tiempo de mis estudios de maestría
- A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por el apoyo recibido durante la maestría y permitirme formar parte de esta excelente casa de estudio.
- Al **Instituto de Ciencias**, y todo su personal por todo el apoyo brindado y disponibilidad para todas las gestiones y asuntos solicitados.
- Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas**, por aceptarme en el programa de Posgrado en Microbiología, por el conocimiento obtenido en este centro y por confiar en mi como alumno.
- Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, por abrirme las puertas para poder desempeñar mi proyecto de investigación, por el aprendizaje de las técnicas utilizadas y por hacerme sentir como en casa por el excelente grupo de trabajo.
- Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padron Nacional de calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021. Además, por el apoyo dado para los gastos de transporte para la asistencia del XLIV Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica en la ciudad de León, Gto.

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, al Departamento de Salud Pública, por su colaboración y aporte dado por el **D.C. Armando Navarro Ocaña** y su grupo de trabajo para la determinación del serotipo de las cepas.
- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada durante los estudios de maestría, con número de becario 632191. Esta tesis forma parte de los proyectos de CONACyT de Ciencia Básica CB-2018-4-FSSEP02-C-2018-4; A1-S-22136

◆ ACADÉMICOS

- A mi asesora la **D.C. Rosa Del Carmen Rocha Gracia**, por confiar en mí y permitirme trabajar con ella y su grupo de trabajo, así como por abrirme las puertas del laboratorio, por ser una gran guía en este proceso de formación y por sus consejos y apoyo brindado en todo momento y sobre todo por impulsarme a seguir con mis estudios y superación académica; por todos los buenos momentos pasados en el laboratorio. Solo me resta darle las gracias y decirle que la estimo mucho, espero haber cumplido con mi desempeño y trabajo en el laboratorio y no haberla defraudado. Muchas GRACIAS por todo.
- A la **D.C. Patricia Lozano Zaráin**, por sus grandes consejos y ser una guía en este proyecto de investigación, además de sus enseñanzas en clases y por esos momentos tan agradables en los que convivimos en el laboratorio, gracias por todo.
- A la **D.C. Margarita María De La Paz Arenas Hernández**, por su apoyo y consejos para el desarrollo de este proyecto y por su orientación y contribución al compartirnos de sus reactivos que ayudaron al desarrollo de esta tesis.
- Al **D.C. Cesar Raúl Gonzales Bonilla**, por su disponibilidad y el tiempo dedicado a este proyecto a pesar de la distancia y por los consejos que enriquecieron esta tesis.
- Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, por su valioso apoyo y guía en el pronto proceso para la titulación.
- Al **D.C. Armando Navarro Ocaña**, por su valioso aporte y apoyo dado por su grupo de trabajo para la determinación del serotipo de las cepas.

Dedicatorias

◆ A mi familia

A mis padres Cecilia y Ramiro por su apoyo incondicional, su paciencia y comprensión por estar tan lejos, ya que fue difícil estar sin ustedes. Gracias a mis padres y su impulso que me daban con sus consejos y a que creyeron en mí, gracias por recibirme con los brazos abiertos cada vez que regresaba a casa por vacaciones y por haber dedicado su esfuerzo y empeño para que yo tuviera una educación, gracias a eso soy la persona que actualmente está concluyendo sus estudios de maestría, gracias por todo, los amo.

A mi hermano Iván y mis tres sobrinos Fredy, Lalo y Diego, por su gran apoyo y comprensión al irme tan lejos de ustedes y perderme momentos tan gratos de sus vidas y recibirme con un gran cariño cada vez que regresaba a casa, los extrañé mucho.

A mi familia entera les dedico este logro que sin su apoyo y palabras de aliento no lo hubiera logrado.

◆ A mi novia

Valeria, primero que nada te agradezco todo este tiempo que has compartido conmigo y sobre todo por el tiempo que compartimos en este gran proceso de crecimiento académico juntos, me alegro enormemente que me hayas acompañado en este viaje y pudiéramos superarnos académicamente juntos, te agradezco el apoyo incondicional y el que me hayas soportado en todos los momentos de estrés por los que pasé, gracias por tus cuidados, por tus palabras, por tu comprensión, por tu paciencia, por tu tolerancia y sobre todo por tu amor, sin ti esto no hubiera sido posible, gracias por estar conmigo, sé que fue una etapa difícil pero muy productiva para los dos y me da mucho gusto que tú también estés terminando tus estudios de maestría a mi lado, por todo muchas gracias TE AMO, esto es todo por ti, especialmente te dedico esta tesis a ti.

◆ A mis amigos y compañeros

A mis amigos de Chihuahua, Gustavo, Oscar, Fernando, Adriana, Hilda que siempre me apoyaron y creyeron en mí, que aun y la distancia siguieron siendo mis amigos y que me recibían con gran gusto cada vez que regresaba a Chihuahua.

A mis amigos y compañeros que gane en Puebla, Edwin, Elena, Alma, Deysi, Flor, Pato, Charly, Yesenia, Miranda, René, Marco, Mariela, Jessica, Cecy, Midory, Diana, Rocio, Nora, Paco, Cristina, por su amistad brindada, por sus conocimientos compartidos, por sus consejos, por su disposición de trabajar en equipo y sobre todo por todos los momentos tan agradables que compartieron conmigo ya que nunca faltaron los chistes, las bromas, gracias a todos.

Les agradezco infinitamente a todas las personas que me apoyaron y formaron parte de este proyecto y esta parte tan importante de mi vida, a mi familia, a mi novia y a mis amigos que siempre estuvieron conmigo dándome animo a todos ustedes les dedico esta tesis ya que sin ustedes yo no podría haber terminado este proyecto solo.

Gracias a todos por todo.

“Por la Ciencia para Bien del Hombre”

Anónimo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 <i>Escherichia coli</i>	2
1.2 Virotipo y serotipo	3
1.3 <i>E. coli</i> en alimentos	4
1.4 Resistencia a los antibióticos	5
1.4.1 Resistencia a antibióticos β -lactámicos	5
1.4.1.1 β -lactamasas de espectro extendido	6
1.4.2 Resistencia a Quinolonas	10
1.4.3 Resistencia a los otros grupos de antibióticos	10
1.5 Plásmidos de resistencia	11
1.5.1 Clasificación plasmídica	12
1.5.1.2 Clasificación por relaxasas	12
1.5.1.3 Sistemas de adicción de los plásmidos	14
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos específicos	22
5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Recolección de muestras	24
6.2 Procesamiento de muestras, aislamiento e identificación de cepas de <i>E. coli</i>	24
6.3 Determinación del perfil de susceptibilidad	26
6.4 Determinación fenotípica de BLEE	27
6.5 Extracción de ADN bacteriano	29
6.5.1 Extracción por método de hervido	29

6.5.2 Extracción de ADN genómico	29
6.5.3 Extracción de ADN plasmídico	29
6.6 Cuantificación y pureza del ADN.....	30
6.7 Búsqueda de genes resistencia	30
6.8 Visualización de los productos de PCR.....	31
6.9 Purificación de los productos de PCR	31
6.10 Secuenciación y análisis de las secuencias de los genes	32
6.11 Determinación del serotipo	32
6.12 Determinación del patotipo diarreogénico	33
6.12 Búsqueda de Islas de patogenicidad.....	33
6.13 Determinación del virotipo.....	35
6.14 Determinación del grupo filogenético	38
6.15 Determinación del perfil plasmídico y caracterización parcial de los plásmidos.....	41
6.15.1 Determinación del perfil plasmídico mediante PFGE-S1.....	41
6.15.2 Caracterización parcial de los plásmidos.....	41
6.15.3 Relación de las características plasmídicas.....	43
6.16 Evaluación de la transferencia de determinantes de resistencia	43
7. RESULTADOS	44
7.1 Resultados del muestreo	44
7.2 Aislamiento e identificación de cepas de <i>E. coli</i>	45
7.3 Perfil de susceptibilidad y fenotipo BLEE de las cepas de <i>E. coli</i>	47
7.4 Identificación de genes que codifican para BLEE y β -lactamasas AmpC	49
7.5 Identificación de genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas	52
7.6 Identificación de genes asociados a la resistencia a tetraciclinas, aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfonamidas y trimetoprim	52
7.7 Determinación del serotipo, patotipo, virotipo y filogrupos de las cepas de <i>E. coli</i>	53
7.7.1 Serotipo de las cepas de <i>E. coli</i>	53
7.7.2 Patotipo de las cepas de <i>E. coli</i>	54
7.7.3 Determinación del virotipo de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos	54
7.7.4 Determinación de filogrupos de las cepas de <i>E. coli</i>	55
7.8 Determinación del perfil plasmídico de las cepas de <i>E. coli</i> y caracterización parcial de los plásmidos involucrados en la resistencia.	58
7.8.1 Perfil plasmídico de las cepas de <i>E. coli</i>	58
7.8.2 Caracterización de los plásmidos de las cepas de <i>E. coli</i>	59
7.9 Evaluación de la transferencia de determinantes de resistencia.	64

8. DISCUSIÓN.....	68
9. CONCLUSIONES.....	76
10. PERSPECTIVAS	78
11. BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXOS	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i>	11
Tabla 2. PCR del gen <i>ybbW</i> para la confirmación de <i>E. coli</i>	25
Tabla 3. Antibióticos y valores de corte del halo de inhibición.....	27
Tabla 4. Componentes de PCR y su concentración, utilizados para la determinación de genes de resistencia.....	31
Tabla 5. Componentes de PCR y su concentración, utilizados para la determinación de PAIs de UPEC.....	34
Tabla 6. Clasificación de <i>E. coli</i> de acuerdo al virotipo.....	35
Tabla 7. Componentes de PCRM y sus concentraciones, utilizados para la determinación del virotipo.....	36
Tabla 8. Genotipo de la PCR cuádruplex y asignación de los filogrupos para <i>E. coli</i> (Tomado de Clermont et al., 2013).	39
Tabla 9. Componentes de las PCRs y sus concentraciones, utilizados para la determinación del grupo filogenético.....	40
Tabla 10. Componentes de PCR triplex y sus concentraciones, utilizados para la determinación de PBRT.....	42
Tabla 11.	46
Tabla 12. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos y fenotipo BLEE de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos.....	49
Tabla 13. Resultado de la determinación de los genes BLEE y CMY en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos.....	50
Tabla 14. Identificación del grupo y variante del gen blaCTX-M en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos.....	51
Tabla 15. Serotipos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos.....	53
Tabla 16. Determinación de las PAIs de cepas prototipo de UPEC, de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos (Sabaté et al., 2006).....	54
Tabla 17. Determinación del Virotipo de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos siguiendo el esquema propuesto por Barrios-Villa para UPEC O25:H4 ST131.....	55
Tabla 18. Determinación del filogrupo de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos.....	56
Tabla 19. Características filogenéticas, fenotípicas y genotípicas (de resistencia y virulencia) de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos.....	57
Tabla 20. Características plasmídicas presentes en las cepas de <i>E. coli</i>	62

Tabla 21. Características de las cepas donadoras y transconjugantes de <i>E. coli</i>	67
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Correlación entre MOB e Inc/rep	13
Figura 2. Metodologías para la detección fenotípica de BLEE	28
Figura 3. Perfil de corrimiento de la PCR cuádruplex para la determinación del grupo filogenético por el método de Clermont	38
Figura 4. Tipos y proporciones de los vegetales ensayados	44
Figura 5. Electroforesis en gele de agarosa del gen <i>ybbW</i>	46
Figura 6. Distribución de las muestras y origen de las cepas de <i>E. coli</i>	47
Figura 7. Perfil de resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos.....	48
Figura 8. Imagen de las metodologías usadas para determinar el fenotipo BLEE	48
Figura 9. Porcentaje de las β -lactamasas presentes en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos	50
Figura 10. Geles de los corrimientos electroforéticos de las PCR de CTX-M G1 y CTX-M-15.....	51
Figura 11. Grafica de los genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas presentes en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales crudos.....	52
Figura 12. Grafica de los genes asociados a la resistencia a los demás grupos de antibióticos presentes en las cepas de <i>E. coli</i>	53
Figura 13. Imagen del corrimiento electroforético de la PCR cuádruplex para determinar el filogrupo.....	56
Figura 14. Perfil plasmídico de las cepas de <i>E. coli</i> obtenido mediante extracción plasmídica por lisis alcalina	58
Figura 15. Perfil plasmídico de las cepas de <i>E. coli</i> obtenido mediante Electroforesis de Campos Pulsados con la enzima S1	59
Figura 16. Grupos de Incompatibilidad plasmídica presentes en las cepas de <i>E. coli</i>	60
Figura 17. Relaxasas presentes en las cepas de <i>E. coli</i>	60
Figura 18. Sistemas de Adicción de los Plásmidos presentes en cepas de <i>E. coli</i>	61
Figura 19. Representación gráfica de Circos de la relación entre las características plasmídicas y las cepas de <i>E. coli</i>	63
Figura 20. Gráfico de los resultados de los ensayos de conjugación	64
Figura 21. Perfiles plasmídicos de las cepas transconjugantes	66

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIEC	<i>Escherichia coli</i> Adherente-Invasiva
BET	Bromuro de Etidio
BHI	Brain Heart Infusion (Infusión cerebro-corazón)
BLEE	β-lactamasa de Espectro Extendido
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Difuso-Adherente
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
dNTP	Deoxi-nucleótido trifosfato
DEC	<i>Escherichia coli</i> Diarreogénica
DPMT	Degenerate Primer MOB Typing (Tipificación MOB con oligonucleótidos Degenerados)
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Entero-Agregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Entero-Hemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Entero-Invasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Entero-Patógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Entero-Toxigénica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraintestinal
gr	Gramos
IS	Insertion sequence (Secuencia de inserción)
kb	Kilobases
L	Litro
LB	Luria Bertani
LMHyC	Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MLST	Multilocus Sequence Typing (Tipificación por Secuencias Multilocus)
M	Molar
mM	Mili Molar
µM	Micro Molar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
orf	Open Reading Frame (Marco de lectura abierto)

pb	Pares de bases
PBRT	PCR-Based Replicon Typing (Tipificación de Replicones Basada en PCR)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel de Campos Pulsados)
rpm	Revoluciones por minuto
SAP	Sistemas de Adicción de los Plásmidos
ST	Secuencia tipo
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de Toxina Shiga
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uro-Patógena

RESUMEN

E. coli representan actualmente un serio problema de salud pública respecto a la resistencia a los antimicrobianos ya que se han reportado en todo el mundo un gran número de cepas multidrogorresistentes, productoras de BLEE y portadoras de cefotaximasa CTX-M. Los determinantes de resistencia y virulencia se encuentran albergados frecuentemente en elementos genéticos movilizables como los plásmidos, transposones e integrones que se diseminan principalmente entre las cepas de *E. coli* e incluso entre diferentes especies o géneros bacterianos mediante la transferencia horizontal de genes. El objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente la resistencia y virulencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de vegetales crudos. A partir de 143 muestras de diferentes vegetales obtenidos de establecimientos fijos y ambulantes de la ciudad de Puebla, se aislaron 12 cepas de *E. coli* multidrogorresistentes (MDR) de las cuales 10 fueron productoras de BLEE y portaban CTX-M-55 (n=6), CTX-M-15 (n=4), TEM (n=4) y OXA1 (n=1) y 2 con fenotipo BLEE negativo que portaban CMY (n=2) y TEM (n=1). El gen plasmídico involucrado en la resistencia a quinolonas fue *qnrB* encontrado en un 41.7% de las cepas; los genes de resistencia involucrados en la resistencia hacia otros grupos de antibióticos identificados fueron, *tetA* en un 75 % de las cepas, *aac(3')-II*, *sul3* y *aadA* en un 58.3%, *dfrA1/5/14* en un 25%, *sul1*, *dfrA12* y *dfrA7/17* en un 16.7% y *catA* en un 8.3%. Las cepas no presentaron factores de virulencia de los patotipos diarreogénicos, pero todas presentaron la PAI-II_{CFT073}, 2 cepas además presentaron la PAI-IV₅₃₆ y una cepa presentó PAI-I_{CFT073}, PAI-II_{CFT073}, PAI-II₅₃₆ y PAI-IV₅₃₆, que se clasificó como UPEC. Con respecto al virotipo, de acuerdo a la clasificación de Barrios-Villa y cols. 2018, la mayoría se clasificó como virotipo 0 seguido del A y se identificó un nuevo virotipo denominado H. La mayoría de las cepas pertenecieron al filogrupo A (n=6), seguido de B1 (n=4), una perteneció al B2 (cepa UPEC) y otra al Clado 1 o 2. Todas las cepas presentaron replicones IncF, siendo el más común el IncFII; presentaron también con mayor frecuencia las relaxasas de la familia MOB-F y una gran cantidad de sistemas de adicción de los plásmidos (3-4 en promedio por cepa) siendo los más comunes *relBE*, *srnBC* y *pemKI*. El 67% de las cepas transfirieron plásmidos, que portaban genes de resistencia a los β -lactámicos, mediante conjugación. También se encontró que algunos plásmidos portan otros genes de resistencia al conferirle a las cepas receptoras resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y tetraciclina. Esto demuestra que los alimentos, como los vegetales que se consumen crudos, pueden ser reservorios de cepas de *E. coli* MDR, que portan plásmidos con diferentes genes de resistencia, siendo estos plásmidos un vehículo para la diseminación de estos determinantes. La diseminación de la resistencia es un serio problema de salud pública ya que se transfieren estas propiedades de virulencia a otras cepas o especies bacterianas con un potencial patógeno mayor que podrían provocar grandes brotes de ETAs de difícil tratamiento.

Este estudio es el primero en reportar características moleculares de virulencia y resistencia en cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos en México, aportando una importante información epidemiológica, para la mejora de la inocuidad alimenticia en nuestro país, así como para el combate a la resistencia a los antimicrobianos.

Palabras Clave: Resistencia antibiótica, BLEE, *E. coli*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Escherichia coli*

En 1885 Theodor Escherich describió por primera vez la bacteria *Bacterium coli commune*, que después fue nombrada *Escherichia coli* (*E. coli*) en su honor. *E. coli* es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, en forma de bacilo que mide de 0.5 a 3 μm , es móvil por flagelos peritricos, es oxidasa negativa y de acuerdo a su taxonomía esta bacteria pertenece al Dominio: *Bacteria*, Filo: *Proteobacteria*, Clase: *Gammaproteobacteria*, Orden: Enterobacteriales, Familia: *Enterobacteriaceae*, Género: *Escherichia* y Especie: *coli* (Dworkin *et al.*, 2006).

E. coli es habitante común del tracto gastrointestinal de humanos y forma parte de su microbiota normal intestinal. Hay cepas que son comensales y que raramente causan enfermedad con excepción de hospederos inmunocomprometidos o con daño en sus barreras gastrointestinales. Estas cepas de *E. coli* son benéficas cuando se encuentra en el intestino como comensal ya que protegen el epitelio gastrointestinal de otras bacterias que causan daño, además proveen al hospedero de vitaminas B12 y K, y activan constantemente el sistema inmune (Torres, 2016). Sin embargo, existen otras cepas que, a través de un proceso evolutivo, han adquirido genes que codifican para factores de virulencia que le confieren una mejor adaptación en otros nichos lo que les permite causar una variedad de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas capaces de causar enfermedad están divididas en dos: las que causan enfermedades intestinales o diarreogénicas (DEC por sus siglas en inglés) y las que causan enfermedades extraintestinales (ExPEC por sus siglas en inglés). Las cepas DEC se separan en seis diferentes categorías de acuerdo a la presencia de factores de virulencia específicos, su epidemiología y las manifestaciones clínicas que provocan:

E. coli enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o Shiga-toxigénica (STEC), *E. coli* difusa-adherente (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC); además, recientemente se han reconocido patotipos híbridos que presentan hipervirulencia como: STEC/EAEC y STEC/ETEC (Torres, 2016) y el patotipo *E. coli* adherente invasiva (AIEC) frecuentemente aislado de pacientes con enfermedad de Crohn (Sepehri *et al.*, 2011). Dentro de las cepas ExPEC las más comunes son: *E. coli* Uropatógena (UPEC) que

causa enfermedades infecciosas del tracto urinario y *E. coli* relacionada a sepsis y meningitis (MNEC) (Kaper *et al.*, 2004).

1.2 Virotipo y serotipo

Las diferentes cepas de *E. coli* catalogadas como patógenos presentan varios factores de virulencia que en algunas de ellas son muy característicos y específicos, como en el caso de las cepas diarreogénicas, por lo que la presencia de los genes de virulencia, le confieren a estas cepas la capacidad de causar una enfermedad diarreica específica pudiéndose clasificar en los diferentes patotipos mencionados anteriormente; pero en el caso de las cepas ExPEC la presencia de estos factores de virulencia son muy variables y no siempre se encuentran los mismos genes en bacterias que causan una misma enfermedad extra-intestinal. Por este motivo se ha investigado la presencia y ausencia de diversos genes para poder clasificarlas en diferentes virotipos (Blanco *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2014). Esta clasificación de acuerdo al virotipo, se ha realizado en cepas provenientes de alimentos de origen animal y está basada en el esquema de virotipificación de UPEC O25:H4 ST131, estableciendo 7 diferentes virotipos (A al G) de acuerdo a la presencia de 11 genes de virulencia: *afa/drBC* (adhesinas Afa/DR), operón *afa* (operón de la adhesina Afa), *iroN* (receptor del sideróforo catecolato), *sat* (toxina autotransportada secretada), *ibeA* (invasina del endotelio cerebral), *papGII* (alelo 2 de la adhesina de la fimbria P), *papGIII* (alelo 3 de la adhesina de la fimbria P), *cnfI* (factor necrotizante citotóxico), *hlyA* (α -hemolisina), *cdtB* (toxina de distensión citoletal) y *neuC-K1* (síntesis de la capsula tipo 1 del grupo 2) (Barrios-Villa *et al.*, 2018).

Los genes de virulencia pueden ser responsables de la variación del tamaño del genoma de *E. coli*, ya que esta bacteria posee un fondo genético flexible que se diferencian por millones de pares de bases; estos genes se localizan generalmente en elementos genéticos móviles dando como resultado una transmisión genética horizontal y una mayor variabilidad genética dentro de la especie. Por todo esto se considera que las cepas de *E. coli* en general son más virulentas cuantos más factores de virulencia distintos posea (Johnson y Nolan, 2009). *E. coli* posee factores de virulencia como son la endotoxina, cápsula, variación antigénica, sistemas de secreción tipo III, secuestro de factores de crecimiento como hierro, resistencia al efecto bactericida del suero y además pueden

adquirir resistencia antimicrobiana. También poseen factores de virulencia especializados como las adhesinas y exotoxinas los cuales son característicos de ciertos patotipos de *E. coli* (Murray *et al.*, 2013).

La serotipificación es otra clasificación que podemos encontrar en bacterias Gram negativas; fue desarrollada por Kauffman, realizó un esquema de serotipificación basado en la identificación de los antígenos O (de las cadenas de polisacáridos del lipopolisacárido), de los antígenos H (pertenecientes a la proteína flagelina encontrada en los flagelos) y del antígeno K (que pertenece a los componentes de la capsula bacteriana); la serotipificación del antígeno O proporciona el serogrupo y en conjunto con el antígeno H proporcionan el serotipo (O:H); la serotipificación es importante porque ayuda a distinguir el número de serogrupos de *E. coli* que pueden causar enfermedad (Wiles *et al.*, 2008). Hasta la fecha se han reportado 187 diferentes antígenos O y 56 diferentes antígenos H para *E. coli* (Stenutz., 2006; Joensen *et al.*, 2015).

1.3 *E. coli* en alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son el resultado del consumo de alimentos contaminados y son frecuentemente de carácter infeccioso, donde *E. coli* es uno de los microorganismos más prevalentes a nivel mundial (OMS, 2019). Ciertos patotipos son transmitidos por alimentos y agua, los microorganismos se ven afectados por múltiples factores limitantes presentes en los alimentos; las cepas DEC son una importante causa de enfermedades intestinales y son reconocidas como enteropatógenos emergentes en todo el mundo (Galli *et al.*, 2016). La determinación de *E. coli* en alimentos y agua es un indicador de contaminación fecal que permite estimar la calidad de los alimentos y agua de acuerdo a su estado de contaminación microbiana (Jay *et al.*, 2005).

Los productos frescos son considerados como buena fuente de nutrientes, por lo que los vegetales crudos son frecuentemente consumidos como parte de una dieta saludable, pero resulta en un riesgo de infecciones gastrointestinales al ingerir, con los vegetales, microorganismos patógenos. Brotes de ETAs han sido asociados al consumo de este tipo de alimentos y además los vegetales representan una vía de exposición a infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos (van Hoke *et al.*, 2015).

1.4 Resistencia a los antibióticos

La plasticidad del genoma de *E. coli* y su capacidad para movilizar y adquirir elementos genéticos le permite emerger como una bacteria que provoca nuevas epidemias debido a la adquisición de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos (Torres, 2016).

Las diferentes cepas de *E. coli* pueden desarrollar resistencia a los antibióticos mediante varios mecanismos los cuales se pueden agrupar en estas categorías:

- 1) Inactivación enzimática: se producen enzimas que inactivan al antibiótico mediante hidrólisis, acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones.
- 2) Modificaciones en el sitio blanco: dentro de este mecanismo existen diferentes estrategias para lograr su objetivo como son: modificaciones genéticas que provocan un cambio estructural en las proteínas blanco del antibiótico, adquisición de genes que codifican para sustitutos del blanco original de los antibióticos o formar una vía metabólica alterna desviando la reacción que es inhibida por el antibiótico.
- 3) Alteraciones de la permeabilidad: la membrana externa de los Gram negativos es impermeable a sustancias hidrofílicas y este tipo de antibióticos queda confinado a pasar a través de porinas por lo que la disminución de la expresión, la alteración estructural y la disminución del tamaño de dichas porinas disminuye el influjo del antibiótico. Además, también se puede alterar la entrada de aminoglucósidos dependientes de energía mediante modificaciones del gradiente electroquímico dificultando la entrada a la célula.
- 4) Bombas de eflujo: este mecanismo afecta a diferentes grupos de antibióticos, mediante diferentes proteínas que funcionan como bombas de eflujo exportando las moléculas de los antibióticos desde el citoplasma hacia el exterior de la célula (Allen *et al.*, 2010).

1.4.1 Resistencia a antibióticos β -lactámicos

El mecanismo más común de resistencia contra antibióticos β -lactámicos entre enterobacterias es la producción de β -lactamasas, que son enzimas que inactivan los antibióticos β -lactámicos y que pertenecen a la misma familia de las serina proteasas de las PBP (Proteínas de unión a penicilina por sus siglas en inglés) (Murray *et al.*, 2013). Las β -lactamasas se clasifican molecularmente de acuerdo a la secuencia de

aminoácidos y motivos conservados en las clases de la A a la D, y de acuerdo a su clasificación funcional se dividen en cuatro grupos basados en sus sustratos e inhibidores (Bush y Jacoby 2010).

1.4.1.1 β -lactamasas de espectro extendido

La resistencia a cefalosporinas de última generación es principalmente conferida por enzimas conocidas como β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de 3era y 4ta generación y monobactámicos; estas enzimas son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico, y pueden ser inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. La mayoría de las BLEE han evolucionado como resultado de mutaciones en el centro activo de las β -lactamasas; estas mutaciones de la secuencia de aminoácidos les permiten mejorar su capacidad de hidrólisis frente a β -lactámicos y esto ocurre por la presión ejercida del amplio e indiscriminado uso de antibióticos β -lactámicos como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, estas enzimas pertenecen al grupo 2be, 2ber y 2de y a las clases A y D (Paterson y Bonomo, 2005). Las familias más comunes de BLEEs encontradas en *E. coli* son: TEM, SHV, CTX-M y OXA (Bajaj *et al.*, 2016).

Los genes de las BLEE pueden ser transmitidos por bacterias de la misma especie o entre diferentes especies a través de plásmidos. Por lo anterior las β -lactamasas plasmídicas ofrecen al menos dos motivos de alerta: su fácil diseminación inter e intraespecie, y su alta variabilidad con el consiguiente aumento del espectro de acción. La mayoría de las diseminaciones de estos genes se dan a nivel intrahospitalario, donde las cepas se transfieren de paciente en paciente y los genes de microorganismo a microorganismo (Alekhun y Levy, 2007).

β -lactamasa TEM

Las BLEE TEM son derivadas de las variantes TEM-1 y TEM-2, que estas dos variantes solo presentan hidrólisis a penicilinas y cefalosporinas de primera generación; la primera BLEE TEM fue la variante TEM-3 reportada en 1988 que presentaba el espectro de hidrólisis característico de las BLEE. Las sustituciones en la secuencia de aminoácidos de TEM han originado una gran cantidad de variantes de las cuales hasta la actualidad

237 diferentes variantes (NCBI BARRGD, 2019) han sido reportadas e incluso algunas de estas son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas y se les denominan TEM resistentes al inhibidor (TRI) (Bradford, 2001).

En *E. coli* *bla*_{TEM} es uno de los genes con mayor prevalencia en aislados clínicos, pero también es común encontrarlo en cepas comensales del intestino, además de que es frecuentemente encontrado en cepas portadoras de *bla*_{CTX-M} lo que sugiere la gran persistencia de este gen, ya que *bla*_{CTX-M} es el determinante de resistencia actualmente más frecuente en aislados clínicos. Debido al potencial evolutivo de estas enzimas y a la emergencia de nuevos alelos resistentes a los inhibidores se anticipa que las TEM en un futuro continuaran contribuyendo de manera importante a la falla en el tratamiento con antibióticos β -lactámicos (Salverda, 2010).

β -lactamasa SHV

A diferencia de TEM, SHV se encuentra con menor frecuencia en *E. coli* y es comúnmente encontrada en *K. pneumoniae* en donde el gen se puede encontrar insertado en su cromosoma. Las BLEE SHV son derivadas de la variante SHV-1, actualmente 228 variantes (NCBI BARRGD, 2019) han sido reportadas y al igual que TEM algunas variantes presentan resistencia a los inhibidores de las enzimas (Bradford, 2001). Estas enzimas se encuentran distribuidas en todo el mundo ampliamente distribuidas en las enterobacterias y se han encontrado en brotes causados por *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (Paterson y Bonomo, 2005).

β -lactamasa CTX-M

Las CTX-M presentan una potente actividad hidrolítica contra cefotaxima y presentan una actividad disminuida contra ceftazidima, aunque algunas variantes confieren resistencia a ambas cefalosporinas, además producen una mayor resistencia hacia cefepime. Actualmente han sido reportado 224 variantes de esta enzima (NCBI BARRGD, 2019). Es común encontrar este gen junto con *bla*_{SHV} o con *bla*_{AmpC} lo cual cambia el fenotipo de resistencia de las cepas (Paterson y Bonomo, 2005).

Las BLEE CTX-M son las más prevalentes en las enterobacterias y es muy común encontrarlas en cepas de *E. coli* aisladas tanto de infecciones nosocomiales como de

infecciones de la comunidad y también han sido encontradas en cepas aisladas de personas sanas, animales, alimentos y aguas residuales (Bajaj, 2016). Se encuentran distribuidas a nivel mundial lo cual es atribuido a plataformas genéticas altamente movilizables que contienen estos genes y que además son co-seleccionados otros genes que confieren resistencia hacia las demás clases de antibióticos. A nivel mundial se han reconocido dos grupos de cepas de *E. coli* que presentan *bla*_{CTX-M-14} o *bla*_{CTX-M-15} distribuidas mundialmente en mayor prevalencia y que presentan una asociación demográfica de estas dos variantes a lo largo de los diferentes países. La variante CTX-M-15 es altamente relacionada a *E. coli* ST131; además, ambas variantes frecuentemente se encuentran en cepas que también presentan resistencia hacia fluoroquinolonas y amoxicilina/ácido clavulánico lo que presenta un gran reto para el tratamiento de las infecciones causadas por estas cepas de *E. coli* ya que estos antibióticos son la alternativa de tratamiento hacia cepas que presentan BLEE (Bajaj, 2016; Bevan *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2010).

β-lactamasa OXA

OXA pertenece a la clase D y es del grupo funcional 2de; estas enzimas confieren resistencia a ampicilina, cefalotina y característicamente tienen una gran actividad hidrolítica hacia oxacilina y cloxacilina y son débilmente inhibidas por ácido clavulánico. Las diferentes variantes presentan poca homología entre ellas demostrando la gran variabilidad en esta familia de enzimas. La mayoría de las BLEE OXA son principalmente encontradas en *P. aeruginosa*, pero también han sido encontradas en *E. coli*, *K. pneumoniae* y otras enterobacterias; varias BLEE OXAs son derivadas de OXA-10 por una o dos sustituciones de aminoácidos que le confieren altos niveles de resistencia a ceftazidima, pero la variante OXA-17 confiere resistencia a cefotaxima y ceftriaxona y poca resistencia a ceftazidima, además confieren resistencia a aztreonam (Bradford, 2001). La mayoría de las variantes no presentan el fenotipo característico de resistencia de las BLEE por lo cual no son consideradas como tal; a pesar de esto se les siguen denominando BLEEs. Hay algunas otras que presentan altas resistencias a los inhibidores de las β-lactamasas y de manera muy importante hay algunas variantes que adquieren actividad de carbapenemasa; la evolución de estas enzimas se ha observado

en paralelo junto con TEM y SHV (Bajaj, 2016), y actualmente se han reportado más de 700 variantes diferentes de OXA (NCBI BARRGD, 2019).

β -lactamasa AmpC

Las β -lactamasas tipo AmpC pertenecen a la clase C de Ambler y al grupo funcional 1, en muchos géneros bacterianos el gen se encuentra en el cromosoma de la bacteria como es el caso de *E. coli* y es inducible mediante un sistema de regulación donde se encuentran los genes *ampD*, *ampG*, *ampR* e intermediarios del reciclaje de peptidoglicanos. En *E. coli* el gen *ampC* es expresado constitutivamente a bajos niveles y es regulado por el crecimiento bacteriano y no por el sistema de regulación ya que el gen *ampR* se ha perdido en el proceso evolutivo de esta bacteria (Philippon, 2002), aunque esta enzima se puede sobreexpresar en cepas que presentan mutaciones en el promotor del gen generando una mayor producción provocando que se presenten fenotipos de resistencia similares a las BLEE además de cefamicinas y a los β -lactámicos combinados con ácido clavulánico (Jacoby, 2009).

También se han descrito algunas AmpC que se encuentran en plásmidos y por lo tanto presentan la capacidad de transferirse horizontalmente entre bacterias, la mayoría de estas enzimas codificadas en plásmidos se encuentran entre las enterobacterias mayormente en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* causantes de infecciones nosocomiales (Pérez-Pérez, 2002). Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas (oximinocefalosporinas) y monobactámicos, además de tener la capacidad de hidrolizar las cefamicinas y no son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico (Black *et al.*, 2005); tienen baja actividad frente cefepime, cefpirome y carbapenémicos (Jacoby, 2009).

Estas enzimas codificadas en plásmidos se encuentran distribuidas en todo el mundo siendo aisladas con mayor frecuencia en cepas clínicas, pero en menor medida que las BLEE; existen diferentes familias de este tipo de enzimas siendo CMY, FOX, ACT, DHA, LAT y MIR las más comúnmente encontradas en *E. coli* y la que se encuentra mayormente diseminada es CMY; estas enzimas son en su mayoría expresadas de manera constitutivas y no inducibles como es el caso de las que se encuentran codificadas en cromosoma. Frecuentemente los plásmidos que portan AmpC también

presentan múltiples genes de resistencia hacia otros grupos de antibióticos lo que deja pocas alternativas de tratamiento en infecciones causadas por cepas portadoras de estos plásmidos (Jacoby, 2009; Philippon, 2002).

1.4.2 Resistencia a Quinolonas

La resistencia a quinolonas puede darse mediante dos mecanismos: por mutaciones en los genes cromosomales o por la presencia de plásmidos que acarrean genes de resistencia a quinolonas. El principal mecanismo cromosomal incluye mutaciones en los genes *gyrA* que codifica para la ADN girasa y en *parC* que codifica para la topoisomerasa IV. Los plásmidos que median la resistencia a quinolonas (PMQR) presentan genes que incluyen: a) cinco familias de genes *qnr* (*qnrA1–7*, *qnrB1–47*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS1–58*) que codifican pequeñas proteínas que protegen las topoisomerasas del ADN de las quinolonas; b) el gen *aac(6′)-Ib-cr*, que codifica una acetiltransferasa que modifica a aminoglucósidos y que también tiene actividad en las fluoroquinolonas, esta enzima transfiere un grupo acetilo al antibiótico inactivándolo; y c) los genes *qepA* y *oqxA/oqxB* que codifican sistemas de eflujo específicos para quinolonas y para multidrogas respectivamente (Álvarez *et al.*, 2015; Chávez *et al.*, 2015)

1.4.3 Resistencia a los otros grupos de antibióticos

Con frecuencia se presentan cepas de *E. coli* MDR, en donde además de presentarse resistencia hacia los principales antibióticos usados para su tratamiento, también se presenta resistencia hacia los demás grupos de antibióticos mediante diferentes mecanismos que son codificados en elementos genéticos movilizables y que en numerosas ocasiones son co-seleccionados con otros genes de resistencia generándose plataformas genéticas multirresistentes. Los mecanismos de resistencia adquiridos mediante elementos genéticos movilizables más comunes presentes en cepas de *E. coli* se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos en *E. coli*

Grupo de antibióticos	Mecanismo de acción	Genes de resistencia
Aminoglucósidos	Inactivación enzimática mediante: fosfotransferasas (APH), acetiltransferasas (AAC) y nucleotidiltransferasas (ANT)	Diferentes variantes de <i>aph</i> (3'), <i>aph</i> (6'), <i>aac</i> (3'), <i>aac</i> (6'), <i>ant</i> (2') y <i>ant</i> (3')
Trimetoprim	Formas alternativas de la enzima blanco	Diferentes variantes de <i>drfA</i> y <i>drfB</i>
Sulfonamidas	Formas alternativas de la enzima blanco	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> y <i>sul3</i>
Tetraciclinas	Bombas de eflujo	<i>tetA</i> y <i>tetB</i>
Cloranfenicol	Inactivación enzimática mediante acetiltransferasas y bombas de eflujo	<i>catA</i> y <i>catB</i> ; <i>floR</i> y <i>cmlA</i>

Fuente: Mosquito *et al.*, 2011; Xiao y Hu, 2012

1.5 Plásmidos de resistencia

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomal capaces de autoreplicarse, estos elementos aumentan la diversidad genética de las bacterias mediante la adquisición y/o pérdida de genes a través del proceso de conjugación (Carattoli *et al.*, 2005).

Los plásmidos de resistencia son los principales elementos responsables en la diseminación de los determinantes de resistencia entre las bacterias ya que estos pueden ser transferidos entre diferentes cepas, especies e incluso géneros bacterianos. Estos plásmidos pueden conferir resistencia hacia la mayoría de los grupos de antibióticos como los β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas, trimetoprim, cloranfenicol, tetraciclinas y macrólidos (Carattoli, 2009).

Los plásmidos tienen la capacidad de adquirir otros elementos genéticos movilizables como transposones, secuencias de inserción, ISCR (secuencias de inserción de región común por sus siglas en inglés) e integrones presentes en algunos de los elementos anteriormente mencionados; estos elementos movilizan genes de resistencia hacia los plásmidos generando plásmidos de multirresistencia.

1.5.1 Clasificación plasmídica

Actualmente la necesidad de clasificar los plásmidos es de gran importancia para los estudios epidemiológicos donde se ven involucrados plásmidos que portan genes de resistencia. La clasificación también permite rastrear y vigilar la diseminación de estos plásmidos en infecciones causadas por bacterias portadoras de estas plataformas plasmídicas en hospitales, en la comunidad o brotes por ETAs.

1.5.1.1 Grupo de incompatibilidad

Los plásmidos que confieren una multidrogorresistencia son en general plásmidos grandes de >50 kb, son autoconjugativos y poseen mecanismos que controlan el número de copias, esto último mediante una pequeña región del mismo que se denomina replicón. EL replicón contiene el origen de replicación (*ori*), las proteínas iniciadoras de la replicación (Rep) y factores reguladores; el estricto control de la replicación genera que dos plásmidos con el mismo replicón, no puedan estar en la misma célula ya que competirían por los mismos mecanismos de control, a esto se le conoce como incompatibilidad plasmídica. Esto ha permitido clasificar a los plásmidos de acuerdo a su grupo de incompatibilidad (Inc/rep) que presenta, siendo esta la clasificación plasmídica más usada (Carattoli, 2013). En 2005 Carattoli y cols. propusieron un esquema formal para la clasificación de los plásmidos, mediante reacciones de PCR, basado en los principales grupos de incompatibilidad de plásmidos que confieren resistencia a los antibióticos entre las enterobacterias; para poder rastrear la dispersión de estos plásmidos en diferentes ambientes (Carattoli *et al.*, 2005). Dentro de las enterobacterias los plásmidos con mayor frecuencia encontrados son IncF, IncA/C, IncL/M, IncN e Inc11 que presentan genes de resistencia para aminoglucósidos, quinolonas, BLEE y/o β -lactamasas AmpC (Carattoli, 2011).

1.5.1.2 Clasificación por relaxasas

Ya que la clasificación basada en inc/rep presenta algunos inconvenientes como: 1) los plásmidos contienen frecuentemente más de un inc/rep, 2) hay otros mecanismos diferentes para iniciar la replicación, por lo que los genes implicados pueden pertenecer a una gran familia de proteínas haciendo difícil su clasificación y 3) aunque en la mayoría

de los casos la clasificación es consistente con la capacidad de movilización de los plásmidos, existen algunos que no tienen esta capacidad y se pueden clasificar como plásmidos que no pueden ser movilizables; se desarrolló otra alternativa basada en la relaxasa conjugativa (MOB), que es la proteína requerida para iniciar la movilización del plásmido mediante el proceso de conjugación bacteriana, siendo este el único componente en común entre los plásmidos movilizables y conjugativos. Esta metodología deja de lado los plásmidos que no tienen la capacidad de movilizarse, pero provee un sistema más robusto y universal para la clasificación de los plásmidos conjugativos y movilizables (Alvarado et al, 2012).

La relación evolutiva de las secuencias de las relaxasas ha permitido clasificar los plásmidos en 5 familias diferentes de MOB y diferentes subfamilias (Figura 1) (Alvarado et al, 2012; Garcillán-Barcia et al., 2009; Francia et al., 2004).

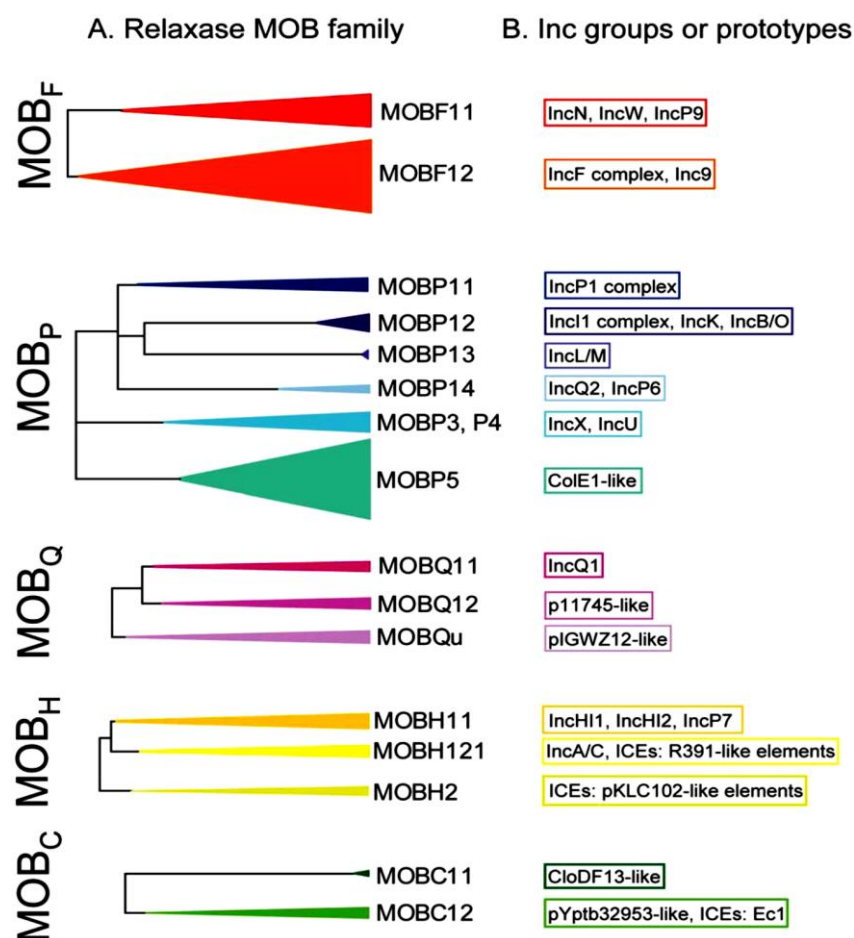


Figura 1. Correlación entre MOB e Inc/rep.

A) Representación filogenética simplificada de 5 familias MOB, los triángulos de colores representan las subfamilias reconocidas mediante DPMT. B) Grupos de incompatibilidad presentes en cada subfamilia MOB se indican en los recuadros de colores. Tomada de Alvarado et al., 2012.

En 2012 Alvarado y cols. desarrollaron una metodología para poder clasificar a los plásmidos de acuerdo a la relaxasa MOB que presentan mediante reacciones de PCR utilizando iniciadores degenerados, que se denomina por sus siglas en ingles DPMT (Degenerate Primer MOB Typing) (Alvarado *et al.*, 2012).

1.5.1.3 Sistemas de adicción de los plásmidos

Muchos plásmidos de resistencia también presentan otros elementos genéticos que contribuyen a su diseminación y prevalencia en las comunidades, como los sistemas de adicción de los plásmidos (SAP) que de manera general son sistemas basados en componentes toxina-antitoxina que tienen la capacidad de matar a las células hijas cuando estas no heredan el plásmido que contiene el SAP durante la división celular (Carattoli, 2013). Estos mecanismos les confieren a los plásmidos la ventaja de permanecer en la célula hospedera, lo que asegura la prevalencia de los plásmidos en la población aun y cuando estos no aportan un beneficio directo a la bacteria (Hayes, 2003). De acuerdo al estudio realizado por Mnif y cols. en 2010, donde evaluaron la presencia de los SAP más prevalentes en cepas de *E. coli* determinaron que los sistemas *pemKI*, *ccdAB*, *vagCD*, *hok-sok* y *srnBC* se presentan en un promedio de 2 a 3 sistemas por cepa; además de que observaron que se presentaba cierta relación con los genes de la BLEE CTX-M y los plásmidos IncF (Mnif *et al.*, 2010), lo que sugiere la importante contribución de estos sistemas en la permanencia y diseminación de los plásmidos de resistencia en las cepas de *E. coli*, como es el caso de las BLEE CTX-M-14 y 15 que se encuentran distribuidas a nivel mundial y en alta prevalencia en cepas de *E. coli* que contienen plásmidos IncF y MOB-F (Carattoli, 2013).

2. ANTECEDENTES

En la actualidad la resistencia a los antimicrobianos representa un serio problema de salud pública a nivel mundial, ya que deja pocas alternativas de tratamiento debido a la aparición de infecciones causadas por cepas multirresistentes y que han generado importantes brotes de ETAs causadas por cepas de *E. coli*. Algunos investigadores han dirigido su atención a esta bacteria realizando diversos estudios sobre sus mecanismos de resistencia y virulencia de *E. coli* involucrada en ETAs.

El tratamiento de infecciones por *E. coli* se ha complicado debido a la emergencia de cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos de primera línea, ya que esta bacteria ha adquirido mecanismos de resistencia a estos antibióticos por su capacidad de transferencia de genes que le confieren esta ventaja (Sabaté *et al.*, 2008).

Las ETAs son el resultado del consumo de alimento contaminado, lo cual es una de las mayores preocupaciones de salud, sobre todo en países en desarrollo en los que es difícil evaluar la incidencia de estas enfermedades. Diferentes estimaciones consideran que, en países desarrollados, una tercera parte de la población se ve afectada anualmente por ETAs, lo que sugiere que en países en desarrollo la incidencia de estas enfermedades es más alta debido a la poca información que se tiene a cerca de este problema (Cherry *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que DEC es uno de los patógenos más comunes de ETAs y esto ha sido reconocido como uno de los problemas de salud más prevalentes a nivel mundial (Torres, 2016).

Las comidas rápidas compuestas por carne, pollo y ensalada que se venden en las calles, en negocios donde producen los alimentos en pequeñas unidades movibles, que no cuentan con el equipo y material adecuado y suficiente para cumplir con las normas de higiene, se asocian con una deficiente sanitización de su ambiente y de acuerdo a esto son un potencial vehículo para bacterias que causan ETAs (OMS, 2019).

De acuerdo a la OMS en su lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos, publicada en febrero del 2017, *E. coli* se encuentra dentro de los patógenos de prioridad crítica o de primera atención, ya que ha adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos y se le considera especialmente peligrosa ya que puede provocar infecciones graves y a menudo letales.

Painter y cols. en 2013 en Estados Unidos determinaron que durante los años del 1998 al 2008 los vegetales de hojas encabezaban la lista de productos que provocaban ETAs y se convirtieron después en alimentos de riesgo regulados por la FDA (Painter *et al.*, 2013).

En España, Sáenz y cols. realizaron un estudio reportado en 2004, en el que se demostró una amplia variedad de genes de resistencia antibiótica en cepas de *E. coli* aisladas de humanos, animales y alimentos, demostrando que este tipo de biota normal puede jugar un papel importante en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos (Sáenz *et al.*, 2004).

Recientemente en una revisión literaria realizado por Alonso y cols. en 2017 de los datos de investigaciones realizadas en países de África, con cepas de *E. coli* de animales de ganadería y humanos, que portaban genes de resistencia antibiótica, mostraron altas tasas de resistencia hacia las tetraciclinas, penicilinas y sulfonamidas; presentaron un incremento en la prevalencia de genes de BLEE y de resistencia a quinolonas que se encontraban codificados en plásmidos. Entre los genes de las BLEE más comunes se encontraron *bla*_{CTX-M} del grupo 1, siendo la variante CTX-M-15 la más común en animales y humanos. También se identificaron principalmente 2 clonas, la ST131/B2 y ST405/D que portaban *bla*_{CTX-M-15}. Además, se observó la circulación de plásmidos IncI1 que portaban *bla*_{CTX-M-1}, Inc Y y plásmidos no tipificables que portaban *bla*_{CTX-M-15} y *qnrS1* y plásmidos IncF que portaban *bla*_{CTX-M-15}. Preocupantemente también se observó el reporte de cepas de *E. coli* portadoras de *bla*OXA-48 y *bla*OXA-181 en el ganado, en Egipto y la presencia de plásmidos emergentes que portan el gen *mcr-1*, que confiere resistencia a colistina, en Argelia, Túnez y Sudáfrica. Esta revisión muestra una urgente

necesidad en la regulación del uso de antibióticos en animales, además de la implementación de programas de vigilancia para la resistencia a los antibióticos (Alonso *et al.*, 2017).

Algunas investigaciones como el estudio realizado por Ben Said y cols. en 2015, han identificado cepas de *E. coli* productoras de BLEE como contaminantes de vegetales, agua y suelo obtenidos de diferentes granjas de cultivo. Las cepas de *E. coli* presentaron *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-1}, así como integrones de clase 1 con estructura *aadA5* + *dfrA17* y también portaban otros genes de resistencia como *sul2*, *tetA*, *tetB*, *strA/strB*, *bla*_{OXA1}, *aac*(6')-Ib-cr y *aac*(3'). Estas cepas tienen de 1 a 2 plásmidos del grupo IncF, IncI1, IncK, IncY e IncB/O en orden de prevalencia. Los genes de las BLEE, específicamente *bla*_{CTX-M-14}, fue transferido por conjugación a partir de 4 cepas donadoras. Las transconjugantes adquirieron un plásmido IncI1 de un peso de 97 kb. Este estudio demuestra que la diseminación de cepas de *E. coli* en los vegetales de granjas es frecuente y que podrían ser transmitidas a los humanos a través de las cadenas alimenticias (Ben Said *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en Seúl Corea, se aislaron 19 cepas bacterianas productoras de BLEE a partir de 189 muestras de vegetales (coles y ensaladas mixtas) listos para su consumo, los cuales fueron comprados en un mercado; 3 de las cepas fueron *E. coli*, todas provenientes de germinados. En la caracterización de estas 3 cepas, los genes BLEE encontrados fueron *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M14} y *bla*_{CTX-M55}. Se demostró que los genes que codifican para las BLEE CTX-M se encontraban en plataformas genéticas *ISEcp1*. Con un entorno genético río arriba *ISEcp1* en ambas variantes (CTX-M-14 y -55) y río abajo del gen *bla*_{CTX-M-14} se encontraba IS903 y río abajo del gen *bla*_{CTX-M-55} se encontraba *orf477*. Esto demuestra la capacidad de movilización de estos genes mediante transferencia horizontal, así como la emergencia de la diseminación de *E. coli* productora de BLEE en vegetales listos para su consumo (Kim *et al.*, 2015).

Un gran brote de diarrea y síndrome urémico hemolítico (SUH) que cobró gran importancia en Europa fue el de Alemania en 2011. Se reportaron más de 3000 casos de los cuales cerca de 800 fueron de SUH. El brote causó la muerte de cerca de 80 personas y fue causado por el consumo de germinados de soya que estaban contaminados con *E. coli* de patotipo híbrido EAEC/EHEC al que denominaron EAHEC. EAHEC de serotipo O104:H4 y un ST678, expresaba fenotipos que incluían la toxina Shiga, adherencia agregativa y la producción de BLEE, causando serios problemas en el tratamiento de los pacientes. Este brote demuestra la gran capacidad de patogenicidad que presentan algunas cepas de *E. coli*, al poder adquirir genes de virulencia y resistencia a los antibióticos (Bielaszewska *et al.*, 2011; Rasko *et al.*, 2011).

En un estudio realizado en una granja de Portugal por Araujo y cols. en 2017, se encontró 38% y 50% de cepas de *E. coli* en muestras de vegetales (n=239) y agua (n=210) respectivamente. El filogrupo más abundante fue B1 (56%) seguido del A (22%); también se encontraron los genes de resistencia *bla*_{TEM}, *tetA*, *tetB* e integrones de clase 1 y 2; además los plásmidos detectados fueron del grupo IncF e IncI1, todo esto en las cepas aisladas de ambas fuentes. Los ST predominantes fueron ST10, ST297 y ST2522 y en algunos casos se presentó el mismo ST en ambas muestras. Adicionalmente se realizaron ensayos de conjugación demostrando la transmisión de plásmidos de resistencia. Con este estudio se pudo identificar que existe un factor de riesgo de contaminación cruzada de *E. coli* entre el agua de riego y las verduras de los cultivos y que además estas cepas tienen la capacidad de transmitir genes de resistencia, pudiendo de esta manera ser transferidas cepas de *E. coli* MDR en la cadena alimenticia (Araujo *et al.*, 2017).

Un estudio realizado en Alemania de 2011 a 2013, se realizó la búsqueda de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en productos alimenticios de origen animal. El estudio se enfocó en la búsqueda del gen *bla*_{CTX-M-15} y se encontró que el 5.2% (n=21) de las cepas aisladas presentaban este gen. Los estudios moleculares revelaron la presencia de dos linajes clonales predominantes que corresponden a A-ST167 aislado con mayor frecuencia en muestras de leche y carne, y que presenta *bla*_{CTX-M-15} que estaba asociado

a un plásmido multireplicón IncF (FII, FIA, FIB) y también presentaba otros genes de resistencia como *aac(6)-Ib-cr*, *bla_{OXA1}*, *catB3*, diferentes variantes de *tet*, así como un integrón de clase 1 con los casetes de genes *aadA5/dfrA17*. Y el otro linaje A-ST140 del cual se identificaron 4 cepas en las que en 3 de ellas se encontró el gen *bla_{CTX-M-15}* insertado en el cromosoma y la otra cepa con un plásmido de 90 kb con un grupo de incompatibilidad IncF. Además, observaron que el gen *bla_{CTX-M-15}* siempre estaba asociado al elemento *ISEcp1*. Estos linajes clonales presentes en los alimentos son una importante vía de diseminación del gen *bla_{CTX-M-15}* en cepas de *E. coli* ya que estas clonas han sido reportadas a nivel mundial, en cepas aisladas de humanos y de ganado (Irrgang *et al.*, 2017).

En Colombia se analizó la calidad microbiológica de las muestras de productos alimenticios (N=380) en leche pasteurizada, jugo de fruta no pasteurizada, carne molida, queso y hortalizas obtenidas en cuatro tiendas minoristas. La prevalencia de contaminación por coliformes, *E. coli* y patotipos de *E. coli* fue de 88.4% (n=334), 53% (n=201) y 2.1% (n=8) respectivamente; las muestras de carne molida y de queso fueron los únicos alimentos contaminados con DEC, siendo EPEC, ETEC y STEC los patotipos detectados; además los estudios de MLST de estas cepas demostraron una relación clonal con las cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea, sugiriendo que los productos alimenticios disponibles en mercados en Cartagena, Colombia pudieran estar involucrados en la transmisión de cepas DEC (Amézquita-Montes *et al.*, 2015).

El consumo de vegetales crudos, como parte de una dieta saludable ha aumentado en México, con lo que han aumentado los casos de infecciones gastrointestinales causadas por patógenos transmitidos por los alimentos, incluidas cepas DEC. En un estudio realizado en México por Castro-Rosas y cols. en 2012, en 130 muestras de ensalada analizadas, el 6.2% estaban contaminadas con cepas DEC, principalmente EIEC, ETEC, y STEC no O157 (Castro-Rosas *et al.*, 2012).

Igualmente, en México en 2016 en un estudio realizado por Gómez-Aldapa y cols. se identificaron cepas DEC en el 8% (n=8) de ensaladas de nopales y en 10% (n=10) de nopales enteros y cortados, lográndose identificar los patotipos STEC, EPEC y ETEC; todas las cepas aisladas mostraron un fenotipo de multidrogorresistencia (Gómez-Aldapa *et al.*, 2016a)

En un estudio realizado en Pachuca, México por Gómez-Aldapa y cols. en 2014, se analizaron muestras de jugo de betabel (N=100) de 4 diferentes mercados observándose en estas muestras la presencia de coliformes (100%), coliformes fecales (75%), *E. coli* (9%) y DEC (4%) de las cuales se determinaron los patotipos EPEC, ETEC y STEC no O157, demostrando que este tipo de alimentos que provienen de vegetales crudos representan un factor importante en la diseminación de cepas DEC en la comunidad (Gómez-Aldapa *et al.*, 2014).

En otro estudio realizado en Hidalgo, México se estudiaron muestras de cilantro (N=100) de diferentes mercados en las que encontraron un 47% (n=47) de presencia de *E. coli* y un 9% (n=9) de cepas DEC; de estas últimas todas presentaron resistencia a múltiples fármacos demostrando una alta incidencia de *E. coli* en este tipo de alimentos y sugieren, de esta manera, un mecanismo de transmisión de genes de resistencia antibiótica en la comunidad que consume este tipo de alimentos (Gómez-Aldapa *et al.*, 2016b).

En Puebla, México Barrios-Villa y cols. en el año 2018 reportaron un estudio realizado con cepas de *E. coli* aisladas de alimentos cárnicos (pollo y puerco), donde se aislaron 16 cepas BLEE positivas (35%) de las cuales 12 pertenecen al filogrupo B1 y 8 cepas fueron portadoras de *bla*_{CMY-2} (17%). Los genes BLEE detectados fueron: *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-2a}, y *bla*_{TEM-52c}. Además, se identificaron otros genes de resistencia como *tetA*, *tetB*, *sul1*, *sul3*, *cmlA*, *aadA*, *dfrA*, *qnrA* y mutaciones cromosómicas que confieren resistencia a quinolonas. Se encontraron 4 nuevos STs. También se determinó el virotipo de las cepas, siendo el más prevalente el virotipo O, seguido del A, B y E (Barrios-Villa *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se ha incrementado en la población el consumo de alimentos nutritivos con la finalidad de llevar una dieta saludable, en la que se incluyen frutas y vegetales crudos. En México, es muy frecuente el consumo de vegetales crudos para acompañar los alimentos preparados y vendidos en establecimientos formales e informales y que forman parte de aspectos culturales de la sociedad mexicana.

El consumo de estos alimentos crudos, puede generar un mecanismo de transmisión de virulencia y resistencia a antibióticos, entre cepas, que conlleva a un aumento de infecciones de difícil tratamiento causadas por enterobacterias como *E. coli*.

La virulencia y la resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* se encuentra mediada principalmente por la transferencia de material genético móvil como los plásmidos, proveniente de otras cepas o especies bacterianas, los cuales pueden contener islas de patogenicidad y genes de virulencia y resistencia a diversos fármacos. El tratamiento de elección que se usa para combatir las infecciones por *E. coli*, incluye los antibióticos β -lactámicos y las quinolonas, pero la resistencia a estos antibióticos está en aumento a nivel mundial.

En México existen pocos reportes que indiquen los patotipos, bagaje de virulencia y mecanismos moleculares involucrados en la resistencia en cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos; por esta razón, en este estudio se pretende realizar la caracterización molecular de la resistencia y virulencia en cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de vegetales crudos y listos para su consumo. El análisis de los resultados nos permitirá establecer si este tipo de alimentos son un reservorio de *E. coli* que poseen genes asociados a virulencia y resistencia y su potencial para diseminarse a otras bacterias de la población en contacto. Al mismo tiempo, nos permitirá entender mejor los mecanismos que *E. coli* usa para la transmisión de los genes de resistencia y virulencia.

4. OBJETIVOS

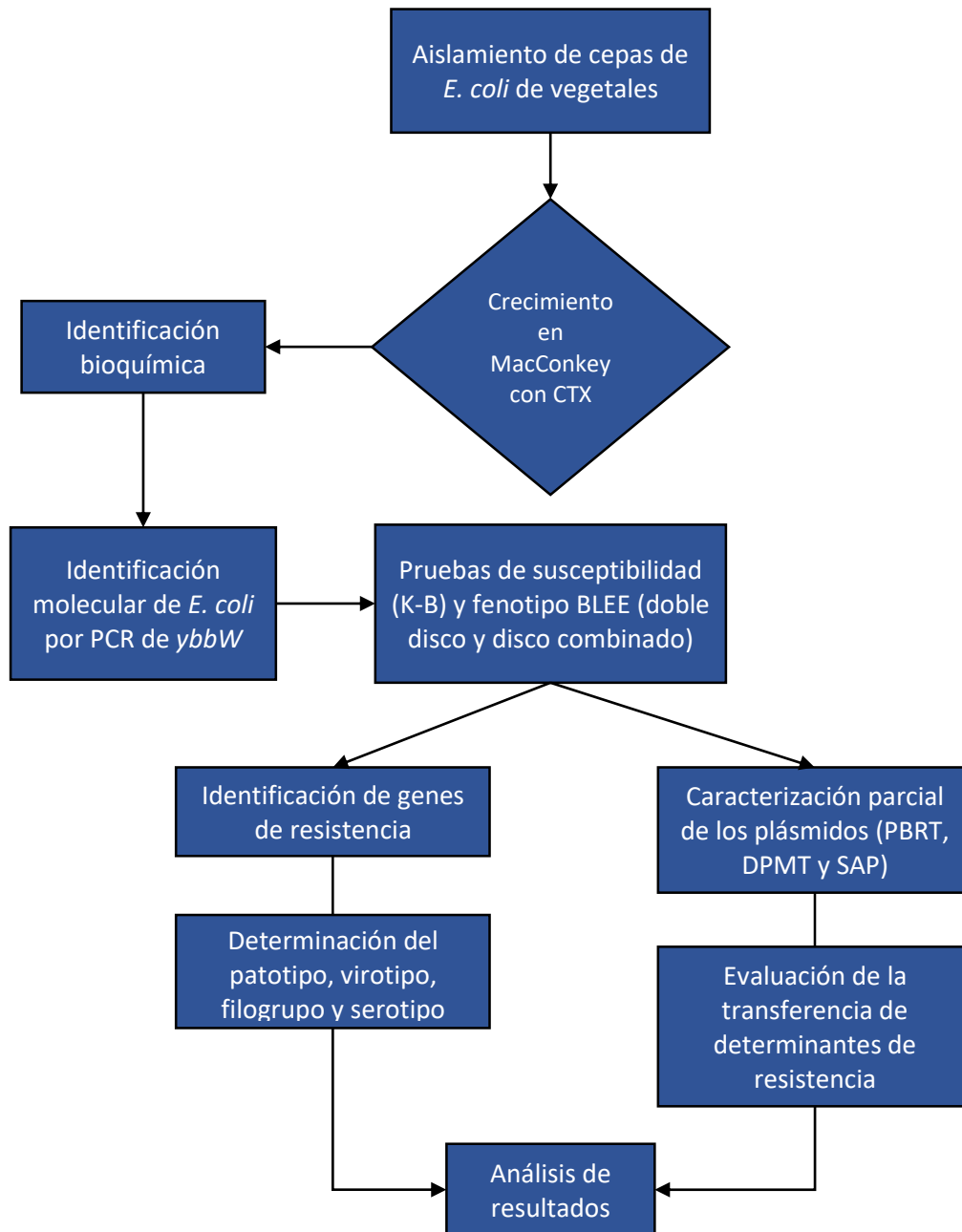
4.1 Objetivo general

- Identificar y caracterizar molecularmente la resistencia y virulencia en cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de vegetales crudos

4.2 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar cepas de *E. coli*, a partir de muestras de vegetales crudos.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos y caracterizar fenotípicamente la producción de BLEE.
3. Identificar genes que codifican para las BLEE y β -lactamasas tipo AmpC.
4. Identificar genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas.
5. Identificar genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas y trimetoprim.
6. Determinar el serotipo, patotipo, virotipo y filogrupo de las cepas de *E. coli*.
7. Determinar el perfil plasmídico de las cepas multirresistentes de *E. coli* y caracterizar parcialmente los plásmidos involucrados en la resistencia.
8. Evaluar la transferencia de determinantes de resistencia.

5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolección de muestras

Las muestras de vegetales crudos listos para su consumo se recolectaron en el periodo de noviembre del 2017 a abril del 2018 a partir de establecimientos fijos y ambulantes de la ciudad de Puebla, Pue. México (anexo 1). Las muestras recolectadas fueron obtenidas comprando los productos en los establecimientos; estas fueron resguardadas en una hielera con refrigerantes a una temperatura de 4 a 8°C y trasladadas de manera inmediata (tiempo de traslado <2 hrs.) al laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) del ICUAP, para su procesamiento.

6.2 Procesamiento de muestras, aislamiento e identificación de cepas de *E. coli*

Para asegurar la mayor recuperación de las cepas, se realizó un pre-enriquecimiento de las muestras pesando 10 gr en condiciones de esterilidad y colocando la muestra en bolsas Ziploc, previamente estériles mediante radiación UV, que contenían 20 mL del caldo Lauril Sulfato de Sodio (BD Bioxon ®); posteriormente las muestras se maceraron manualmente y se incubaron a 35°C durante 24 hrs. en agitación a una velocidad de 30 rpm.

Después del enriquecimiento previo de las muestras, se tomaron 100 µL del caldo con crecimiento y se inocularon en placas de agar Mac Conkey (BD Bioxon ®) adicionado con 2 µg/mL de cefotaxima (CTX), para obtener cepas presuntivamente resistentes a β-lactámicos. Se estrieron las placas por el método de estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 hrs.

A continuación, se seleccionaron las cepas con morfología característica de *E. coli* y se reaislaron en Mac Conkey con CTX hasta obtener cepas puras. Estas cepas se sembraron en agar Levine (BD BBL ®) + CTX, a la misma concentración usada previamente, para corroborar la morfología colonial característica de *E. coli* en este medio. Las cepas con morfología colonial presuntiva de *E. coli* se sembraron en agar TSA (BD Bioxon ®) y se incubaron a 37°C durante 24 hrs. para su posterior conservación en viales con caldo BHI + glicerol al 10%, a una temperatura de -70°C.

Las cepas se identificaron de acuerdo a los esquemas del manual de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin

(MacFaddin, 2003) y a la clasificación taxonómica del Bergey's Manual of systematics of Archaea and Bacteria, *Enterobacteriaceae* (Brenner & Farmer, 2015), mediante pruebas bioquímicas: TSI (Agar Hierro Triple Azúcar), LIA (Agar Hierro y Lisina), CIT (Agar Citrato de Simmons), FEA (Agar Fenilalanina), Urea, MIO (Medio Movilidad, Indol Ornitina), SIM (Medio H₂S, Indol, Movilidad), VP (Voges Proskauer) y RM (Rojo de Metilo).

Adicionalmente se realizó la identificación por PCR del gen *ybbW* (tabla 2), que codifica para un transportador de alantoína y que es altamente específico de *E. coli* (Walker *et al.*, 2017), para asegurarse mediante este método molecular de que las cepas identificadas bioquímicamente fueran realmente *E. coli*.

Tabla 2. PCR del gen *ybbW* para la confirmación de *E. coli*

Secuencia de iniciadores y condiciones de PCR			
Iniciadores (5'→3')	Condiciones de reacción	Tamaño de amplificado	Referencia
ybbW-F: TGATTGGCAAAATCTGGCCG	94°C 4 min. 1 ciclo 94°C 30 seg. 63°C 30 seg. 35 ciclos 72°C 45 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo 10°C pausa	667 pb	Walker <i>et al.</i> , 2017
ybbW-R: ATACTGGCAATCAGTACGCC			Este estudio ^a
Componentes y su concentración en la PCR			
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Agua	-	6.4µl	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1µl	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	1µl	2.5 mM
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.4µl	0.4 mM
Iniciador delantero (Sigma)	25µM	0.3µl	0.75 µM
Iniciador reverso (Sigma)	25µM	0.3µl	0.75 µM
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific®)	5 U/µl	0.1µl	0.5 U
ADN ^b	100 ng/µl	0.5µl	5 ng/µl
Volumen final de la reacción		10µl	

^a: El iniciador reverso fue diseñado en el presente estudio para obtener un fragmento más grande del gen.

^b: ADN templado obtenido mediante el método de hervido y ajustado a la concentración especificada.

6.3 Determinación del perfil de susceptibilidad

Se realizó la determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos (tabla 3) a las cepas de *E. coli* aisladas que fueron resistentes a CTX, esto mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer de acuerdo a los estándares del CLSI descritos en sus documentos M02-A12 (CLSI, 2015) y M100-S28 (CLSI, 2018).

A partir de un cultivo puro de 24 horas, sembrado en agar TSA (BD Bioxon®), se resuspendieron de 2 a 4 colonias en un tubo con 2 ml de solución salina isotónica (SSI) al 0.85% de NaCl, hasta alcanzar una turbidez igual a 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml). De esta suspensión se impregnó un hisopo de algodón estéril y se inocularon placas de agar Müller-Hinton (BD Bioxon®), estriando con el hisopo toda la placa de manera masiva en tres diferentes direcciones rotando la placa unos 60° cada vez y pasando por último el hisopo sobre la periferia de la placa para conseguir un crecimiento uniforme. Posteriormente, se colocaron los sensidiscos de antimicrobianos con la ayuda de pinzas esterilizadas por alcohol y calor, no se colocaron más de 6 sensidiscos por placa y se respetó una distancia entre centro y centro de los sensidiscos de 2.5 cm. Las placas se incubaron posteriormente a 37 °C durante 16-18 horas. Finalmente, se midieron los halos de inhibición y los resultados se interpretaron de acuerdo a los puntos de corte de la tabla 2A del documento M100-S28 (CLSI, 2018) (Tabla 3). La cepa *E. coli* ATCC 25922 fue usada como cepa control.

Las cepas se clasificaron como MDR de acuerdo a los criterios de Magiorakos y cols. (2011) que establecen que una enterobacteria MDR es resistente por lo menos a 1 antibiótico, de 3 o más diferentes grupos de antibióticos.

Tabla 3. Antibióticos y valores de corte del halo de inhibición

Grupo o familia	Antibiótico (BBL®)	Contenido (µg)	Abreviación	Criterios de interpretación de acuerdo al halo de inhibición (mm) ^a			
				S	SSD	I	R
Penicilinas	Ampicilina	10	AM	≥17	-	14-16	≤13
Penicilinas con inhibidor	Amoxicilina/ A. clavulánico	20/10.	AMC	≥18	-	14-17	≤13
Cefalosporinas	Cefuroxima	30	CXM	≥23	-	15-22	≤14
	Cefotaxima	30	CTX	≥23	-	20-22	≤19
	Ceftazidima	30	CAZ	≥21	-	18-20	≤17
	Cefepime	30	FEP	≥25	19-24	-	≤18
Cefamicinas	Cefoxitina	30	FOX	≥18	-	15-17	≤14
Monobactámicos	Aztreonam	30	ATM	≥21	-	18-20	≤17
Carbapenémicos	Meropenem	10	MEM	≥23	-	20-22	≤19
	Imipenem	10	IMP	≥23	-	20-22	≤19
Aminoglucósidos	Amikacina	30	AN	≥17	-	15-16	≤14
	Gentamicina	10	GM	≥15	-	13-14	≤12
	Estreptomina	10	S	≥15	-	12-14	≤11
	Tobramicina	10	NN	≥15	-	13-14	≤12
Quinolonas	Ácido nalidíxico	30	NA	≥19	-	14-18	≤13
	Ciprofloxacina	5	CIP	≥21	-	16-20	≤15
Inhibidores de folatos	Trimetoprim	5	TMP	≥16	-	11-15	≤10
	Trimetoprim/ Sulfametoxazol	1.25/ 23.75	SXT	≥16	-	11-15	≤10
Fenicoles	Cloranfenicol	30	C	≥18	-	13-17	≤12
Tetraciclinas	Tetraciclina	30	TET	≥15	-	12-14	≤11

a: los puntos de corte fueron obtenidos de la tabla 2A del documento M100-S28 del CLSI del año 2018. S: sensible; SSD: sensible dependiente de dosis; I: intermedio; R: Resistente

6.4 Determinación fenotípica de BLEE

A todas las cepas a las que se les realizó el perfil de susceptibilidad también se les determinó la producción fenotípica de BLEE mediante 2 metodologías diferentes: por el método de Jarlier propuesto por el EUCAST (difusión de doble disco) y por el método propuesto por el CLSI 2018 (difusión de disco combinado).

Para ambas metodologías se realizó el mismo procedimiento utilizado para el perfil de susceptibilidad, descrito en el punto anterior, ya que es una metodología muy semejante pero la única diferencia es la distribución de los sensidiscos en la placa inoculada.

Para el método de difusión de doble disco se utilizaron los sensidiscos AMC, CTX, CAZ, FEP y ATM, colocando el sensidisco de AMC en el centro de la placa y el resto alrededor respetando una distancia de 25 mm de centro a centro como se indica en la figura 2. Para este método si se presenta un sinergismo entre CTX, CAZ, FEP y ATM con AMC se observó una ampliación del halo de inhibición en la zona de contacto de los 2 antibióticos, observándose una forma de cola de pescado o de ojo de cerradura, interpretándose como una prueba positiva para la producción de BLEE.

Para el método de difusión de disco combinado se utilizaron los sensidiscos CTX, CAZ, CCT (CTX + Ac. clavulánico, Bio-Rad ®), CCA (CAZ + Ac. clavulánico, Bio-Rad ®), colocándose en la placa como se indica en la figura 2. Para este método si en el sensidisco que contiene el Ac. clavulánico (CCT o CCA) se presenta un halo de inhibición ≥ 5 mm con respecto al sensidisco que contiene el antibiótico sin el inhibidor (CTX o CAZ) se considera como una prueba positiva para la producción de BLEE.

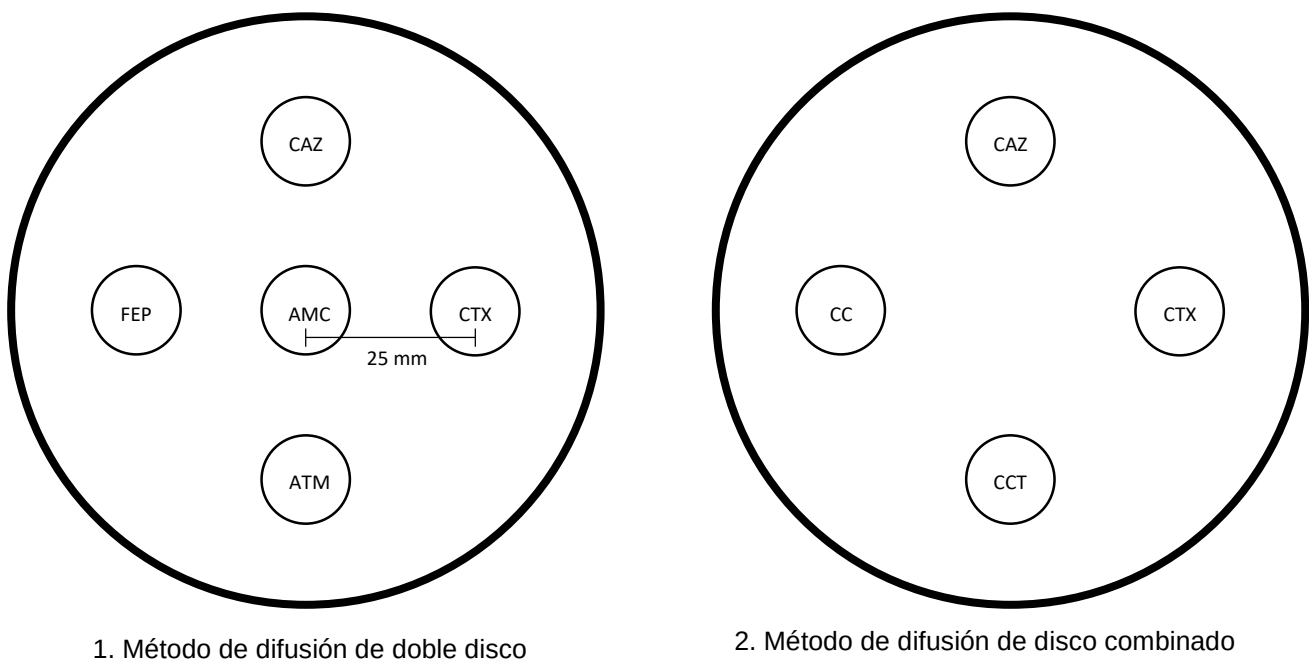


Figura 2. Metodologías para la detección fenotípica de BLEE.

En la figura se muestra representación gráfica de la distribución de los sensidisco para la determinación de la producción fenotípica de BLEE. 1) Representación del método de difusión de doble disco. 2) representación del método de difusión de disco combinado.

6.5 Extracción de ADN bacteriano

La extracción del material genético de las cepas de *E. coli*, se realizó mediante diferentes metodologías de acuerdo al uso posterior que se le iba a dar al ADN para la caracterización molecular de los genes por las metodologías descritas posteriormente.

6.5.1 Extracción por método de hervido

Para la extracción del templado de ADN total se utilizó el método de extracto hervido. A partir de un cultivo puro incubado por 24 hrs. en caldo LB, se empaquetaron 3 ml del cultivo en un tubo Eppendorf estéril centrifugándolo a 13,000 rpm durante 5 min. Después se decantó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla; en el mismo tubo con la pastilla se agregaron 500 µl de agua inyectable estéril y se resuspendió la pastilla con la ayuda de la micropipeta. Posteriormente se colocó el tubo en baño maría a una temperatura de ebullición durante 15 min. para lisar las células; después del proceso de calentamiento, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min. para separar los restos celulares del material genético; posteriormente se recuperó el sobrenadante (que contiene el ADN total) en nuevos tubos Eppendorf estériles con cuidado de no llevarse restos de la pastilla del fondo; el material genético fue conservado en congelación a -20°C.

6.5.2 Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó mediante el kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification, siguiendo las instrucciones del procedimiento proporcionado por el fabricante (Anexo 3)

6.5.3 Extracción de ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico se realizó mediante el método de Kieser modificado por Barrios-Villa, a la cual se le realizaron ligeras modificaciones que se detallan en el anexo 3.

6.6 Cuantificación y pureza del ADN

La concentración y pureza del ADN fue medida y ajustada a 100 ng/ μ l con la ayuda del equipo NanoDrop 2000c mediante la lectura de la muestra a 260 nm para determinar la concentración de ADN de doble cadena; la pureza del ADN fue evaluada mediante la determinación del cociente de las absorbancias 260/280 nm considerando como una buena pureza un valor de 1.7 a 2.0 y la integridad del ADN fue evaluada por electroforesis corriendo una muestra de 10 μ l del extracto en un gel de agarosa al 0.7% y tiñendo el gel con Bromuro de Etidio (BET) (Sigma®) a una concentración de 4 μ g/ml, para después tomar la fotografía en el fotodocumentador MiniBIS Pro y poder determinar la integridad del ADN.

6.7 Búsqueda de genes resistencia

Se realizó la búsqueda de los genes involucrados en la resistencia a los antibióticos, de las cepas de *E. coli* mediante la técnica de PCR. Los genes que se buscaron para las BLEE fueron *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} y *bla*_{CTX-M}, así como los diferentes grupos de esta última: *bla*_{CTX-M G1}, *bla*_{CTX-M G2}, *bla*_{CTX-M G8}, *bla*_{CTX-M G9}; además, se buscó *bla*_{CTX-M-15}.

En el caso de la resistencia a quinolonas se buscaron los genes que codifican para pequeños péptidos protectores: *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*; el gen para la enzima *aac*(6')-Ib y genes que codifican para bombas de eflujo: *qepA*, *oqxA* y *oqxB*.

Para los demás grupos de antibióticos se buscaron los siguientes genes: para aminoglucósidos: *aac*(3')-II y *aadA*; sulfonamidas: *sul1* y *sul3*; trimetoprim: *dfrA* y *drfB*; cloranfenicol: *cmIA* y *catA* y para tetraciclinas: *tetA* y *tetB*.

En el anexo 2 se encuentran los iniciadores utilizados y las condiciones de la reacción para cada par de ellos. En la tabla 4 se encuentran los componentes, así como sus concentraciones utilizadas para realizar las PCR.

Tabla 4. Componentes de PCR y su concentración, utilizados para la determinación de genes de resistencia.

Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Agua	-	6.4µl	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1µl	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	1µl	2.5 mM
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.4µl	0.4 mM
Iniciador delantero (Sigma)	25µM	0.3µl	0.75 µM
Iniciador reverso (Sigma)	25µM	0.3µl	0.75 µM
Taq Hot Start DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.1µl	0.5 U
ADN ^a	100 ng/µl	0.5µl	5 ng/µl
Volumen final de la reacción		10µl	

^a: ADN templado obtenido mediante el método de hervido y ajustado a la concentración especificada.

6.8 Visualización de los productos de PCR

Para la visualización de los productos de las PCR se realizó una electroforesis de ADN, corriendo los productos en un gel de agarosa al 1%, utilizando el buffer TAE 1X a 100 Voltios durante 45-60 min. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®) para poder identificar el tamaño del fragmento amplificado y se usó un buffer de carga para colocar las muestras en el gel. Posteriormente se tiñeron los geles con BET (4 µg/ml) durante 10-30 seg y se lavaron con agua destilada para retirar el exceso de BET durante 20-30 min. A continuación, se procedió a la visualización y digitalización del gel con ayuda del fotodocumentador MiniBIS Pro para poder analizar los resultados de la PCR.

6.9 Purificación de los productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit de purificación Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, para lo cual se siguió el procedimiento del fabricante que se describe en el anexo 3.

Una vez purificados los productos se procedió a cuantificar el ADN en el equipo NanoDrop 2000c y se verificó la integridad del producto corriendo 1 µl en un gel de agarosa al 1%. Los productos purificados y verificados se almacenaron a -20°C hasta posterior uso.

6.10 Secuenciación y análisis de las secuencias de los genes

Los productos que se purificaron fueron utilizados para determinar la secuencia de estos enviando la muestra al Laboratorio de Servicios Genómicos LANGEBIO del Cinvestav y a la Unidad de Síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los productos se enviaron de acuerdo a los requerimientos de cada uno de los laboratorios que prestaron el servicio de secuenciación.

El análisis de las secuencias se realizó con la ayuda de los programas Finch TV versión 1.4.0, Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3 y MEGA X versión 10.0.5.

Además de la ayuda de las siguientes herramientas bioinformáticas:

- BLAST, NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Sequence Massager (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>)
- Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
- Translate tool ExpASy (<https://web.expasy.org/translate/>)

Para determinar las variantes de los genes de resistencia se usó como referencia los genes de la base de datos Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database, del NCBI (BARRGD).

6.11 Determinación del serotipo

Para la determinación del serotipo de las cepas se contó con la colaboración del D.C. Armando Navarro Ocaña del Departamento de Salud Pública de la UNAM.

Se mandaron las cepas en tubos Eppendorf con agar TSA en pico de flauta, transportándolas en temperatura de refrigeración. Se realizó la identificación del serotipo mediante el método de aglutinación en placa (Qrskov and Orskov, 1984) utilizando suero de conejo obtenido de 187 antígenos somáticos y 53 flagelares específicos de *E. coli*.

6.12 Determinación del patotipo diarreogénico

Para poder determinar el patotipo diarreogénico de las cepas aisladas de *E. coli* se buscaron los marcadores genéticos de los factores de virulencia para cada uno de estos mediante la técnica de PCR amplificando los siguientes genes de cada patotipo. EPEC: *eae*, *bfpA* y pEAF; ETEC: ST-Ia, ST-Ib y LT; EHEC: STx-1 y STx-2; EIEC: *ial*; DAEC: *daaE*; EAEC: pAA (Vargas *et al.*, 1998; Rodríguez, 2002; Gunzburg *et al.*, 1995; Fratamico *et al.*, 1995; Rodríguez, 2002; Franke *et al.*, 1994; Gunzburg *et al.*, 1995; Gannon *et al.*, 1993; Bassa *et al.*, 2010; Mansan-Almeida *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 1995). Las secuencias de los iniciadores usados para las PCR, así como las condiciones de las reacciones se encuentran en el anexo 2. Los componentes de las reacciones y sus concentraciones usadas fueron las mismas de la tabla 4.

6.12 Búsqueda de Islas de patogenicidad

Para las búsquedas de las islas de patogenicidad (PAI) de cepas prototipo de UPEC, se contó con la colaboración de la D.C Margarita María De La Paz Arenas Hernández del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos, que nos proporcionó los iniciadores para la búsqueda de las PAIs mediante PCR de las diferentes cepas de UPEC que a continuación se mencionan. Para la cepa CFT073 la PAI-I y PAI-II, para la cepa 536 las PAI-I a PAI-IV y para la cepa J96 las PAI-I y PAI-II.

Las secuencias de los iniciadores usados para las PCR, así como las condiciones de las reacciones se encuentran en el anexo 2. Para las PAIs de las cepas CFT073 y J96 se realizaron PCR simples y para las PAIs de la cepa 536 se realizaron PCR dúplex. Los componentes de las reacciones y sus concentraciones se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes de PCR y su concentración, utilizados para la determinación de PAIs de UPEC.

Componentes y su concentración en las PCR simples					
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción			
		PAI-I CFT073	PAI-II CFT073	PAI-I _{J96}	PAI-II _{J96}
Agua	-	6.56µl	3.2µl	3.7µl	3.32µl
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	0.8µl	0.25µl	0.25µl	0.4µl
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	0.4µl	0.25µl	0.25µl	0.12µl
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.16µl	0.08µl	0.1µl	0.12µl
Iniciador delantero (Sigma)	25µM	0.6µl	0.35µl	0.2µl	0.6µl
Iniciador reverso (Sigma)	25µM	0.6µl	0.35µl	0.2µl	0.6µl
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.1µl	0.04µl	0.06µl	0.04µl
ADN ^a	100 ng/µl	1µl	1µl	1µl	1µl
Volumen final de la reacción		10.22µl	5.52µl	5.76 µl	6.2µl
Componentes y su concentración en las PCR dúplex					
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción			
		PAI-I / II ₅₃₆		PAI-III / IV ₅₃₆	
Agua	-	4.4µl		4.4µl	
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1µl		1µl	
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	1µl		1µl	
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.5µl		0.5µl	
Iniciador delantero (1.9/orf1up)	25µM	0.8µl		0.5µl	
Iniciador reverso (1.10/orf1down)	25µM	0.8µl		0.5µl	
Iniciador delantero (sfal.1/IRP2FP)	25µM	0.2µl		0.5µl	
Iniciador reverso (sfal.2/IRP2RP)	25µM	0.2µl		0.5µl	
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.1µl		0.1µl	
ADN ^a	100 ng/µl	1µl		1µl	
Volumen final de la reacción		10µl		10 µl	

^a: ADN templado obtenido mediante el método de hervido y ajustado a la concentración especificada.

6.13 Determinación del virotipo

Para determinar el virotipo de las cepas de *E. coli* se buscaron los siguientes genes que codifican para factores de virulencia: *afa/dra* BC, operón *afa*, *iroN*, *sat*, *ibeA*, *papGII*, *papGIII*, *cnf*, *hlyA*, *cdtB*, *neu*(K) y de acuerdo a la presencia o ausencia de estos factores de virulencia se clasificaron las cepas en los diferentes virotipos como se indica en la tabla 6. La determinación de los virotipos se realizó mediante PCR simples y múltiples como se indica a continuación; se realizó una PCR triplex para la detección de *iroN*, *cnf* y *afa/dra*BC, una PCR triplex para *vatA*, *vatP* y *papGII*, una PCR dúplex para *neu*-K1 y *neu*-K2, una PCR duplex para *hlyA* y *satP* y PCR simples para operón *afa*, *cdtB*, *ibeA*, *satA* y *papGIII*. La secuencia de los iniciadores y las condiciones de las PCR se encuentran en el anexo 2. Los componentes y sus concentraciones de las PCR triplex y dúplex se detallan en la tabla 7. Para las PCR simple se usaron los mismos componentes y sus concentraciones reportados en la tabla 4.

Tabla 6. Clasificación de *E. coli* de acuerdo al virotipo

Virotipo	Genes de virulencia										
	<i>afa/dra</i> BC	Operón <i>afa</i>	<i>iroN</i>	<i>sat</i>	<i>ibeA</i>	<i>papGII</i>	<i>cnf</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGIII</i>	<i>cdtB</i>	<i>neu</i> -K1
A	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
E	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Barrios-Villa *et al.*, 2018; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014

Tabla 7. Componentes de PCRM y sus concentraciones, utilizados para la determinación del virotipo.

Componentes y su concentración en la PCR triplex 1 (<i>iroN</i> , <i>cnf</i> y <i>afa/dra</i> BC)			
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Agua	-	5.2µl	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1µl	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	1µl	2.5mM
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.4µl	0.4mM
Iniciador delantero (<i>iroN</i> -F)	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador reverso (<i>iroN</i> -R)	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador delantero (<i>cnf</i> -f)	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador reverso (<i>cnf</i> -r)	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador delantero (<i>afa</i> -dra-F)	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador reverso (<i>afa</i> -dra-R)	25µM	0.3µl	0.75µM
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.1µl	0.5 U
ADN ^a	100 ng/µl	0.5µl	5ng/µl
Volumen final de la reacción		10µl	
Componentes y su concentración en la PCR triplex 2 (<i>vatA</i> , <i>vatP</i> y <i>papGII</i>)			
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	
Agua	-	2.8µl	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1µl	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	1µl	2.5 Mm
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.4µl	0.4 mM
Iniciador delantero (<i>vatA</i> 1076F)	25µM	0.45µl	1.125µM
Iniciador reverso (<i>vatA</i> 1406R)	25µM	0.45µl	1.125µM
Iniciador delantero (<i>vatP</i> -86F)	25µM	0.35µl	0.875µM
Iniciador reverso (<i>vatP</i> 226R)	25µM	0.35µl	0.875µM
Iniciador delantero (<i>papGII</i> -F)	25µM	0.85µl	2.125µM
Iniciador reverso (<i>papGII</i> -R)	25µM	0.85µl	2.125µM
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.1µl	0.5 U
ADN ^a	100 ng/µl	1.4µl	14 ng/µl
Volumen final de la reacción		10µl	

Componentes y su concentración en la PCR dúplex 1 (<i>neu-K1</i> y <i>neu-K2</i>)			
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Agua	-	5.8µl	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1µl	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	1µl	2.5mM
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.4µl	0.4mM
Iniciador delantero (kpsII-f)	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador reverso (kpsII-r)	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador delantero (KI-f)	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador reverso (kpsII-r)	25µM	0.3µl	0.75µM
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.1µl	0.5 U
ADN ^a	100 ng/µl	0.5µl	5ng/µl
Volumen final de la reacción		10µl	
Componentes y su concentración en la PCR dúplex 2 (<i>hlyA</i> y <i>satP</i>)			
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Agua	-	5µl	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1µl	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	1µl	2.5mM
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.4µl	0.4mM
Iniciador delantero (hlyA-F)	25µM	0.6µl	1.5µM
Iniciador reverso (hlyA-R)	25µM	0.6µl	1.5µM
Iniciador delantero (satP-F)	25µM	0.4µl	1µM
Iniciador reverso (satP-R)	25µM	0.4µl	1µM
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.1µl	0.5 U
ADN ^a	100 ng/µl	0.5µl	5ng/µl
Volumen final de la reacción		10µl	

^a: ADN templado obtenido mediante el método de hervido y ajustado a la concentración especificada.

6.14 Determinación del grupo filogenético

Se determinó el grupo filogenético al cual pertenecen las cepas de *E. coli* aisladas, mediante la metodología descrita por Clermont y cols. (Clermont *et al.*, 2013) que se basa en la detección de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 mediante una PCR cuádruplex; en caso de no poder determinar el filogrupo con esta PCR se realiza la búsqueda de los genes *trpA* específico para el filogrupo C y otro fragmento específico del filogrupo E en el gen *arpA*, mediante PCR simples.

Por lo tanto, se inició la búsqueda de los genes mediante la PCR cuádruplex (figura 3) y en caso de ser necesario se realizaron las PCR simples para poder determinar el filogrupo (tabla 8). Las secuencias de los oligonucleótidos y las condiciones de la reacción se encuentran en el anexo 2. Los componentes y sus concentraciones en las reacciones de PCR se encuentran en la tabla 9.

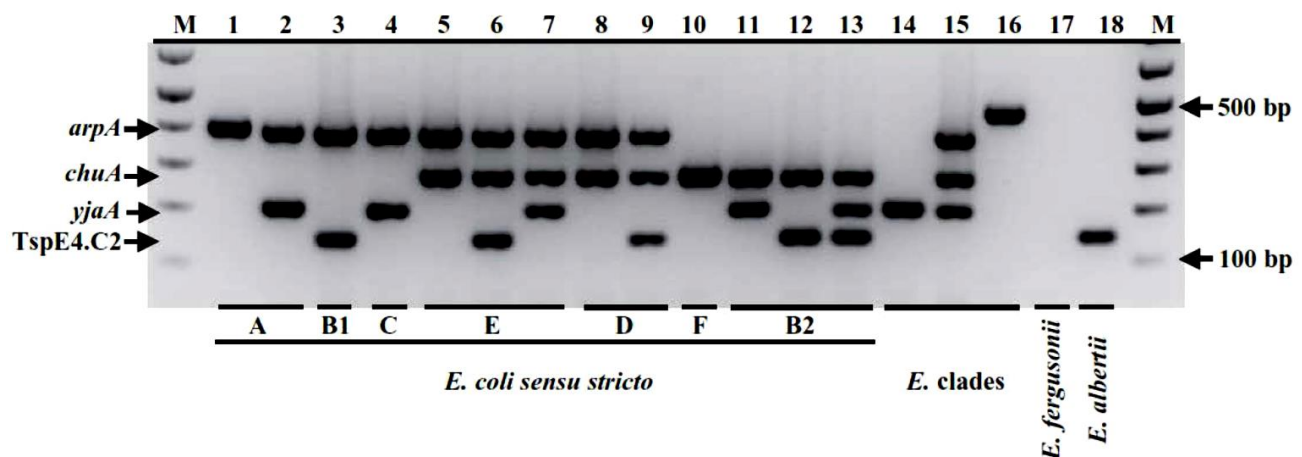


Figura 3. Perfil de corrimiento de la PCR cuádruplex para la determinación del grupo filogenético por el método de Clermont.

Carril 1, grupo A (REL606, + - - -); 2, grupo A (K-12 MG1655, + - + -); 3, grupo B1 (IAI1, + - - +); 4, grupo C (ECOR70, + - - -); 5, grupo E (EDL933, + + - -); 6, grupo E (ECOR31, + + - +); 7, grupo E (E101, + + + -); 8, grupo D (UMN026, + + - -); 9, grupo D (Py199, + + - +); 10, grupo F (IAI39, - + - -); 11, grupo B2 (ECOR60, - + + -); 12, grupo B2 (IAI53, - + - +); 13, grupo B2 (ED1a, - + + +); grupo 14, *Escherichia* clado I (M863, - - + -); 15, *Escherichia* clado I (IAI32, + + + -); 16, *Escherichia* clado V [E1118, (476)- - - -], la banda adicional de (476 pb) corresponde a la amplificación de *chuA* con los oligonucleótidos chuA2 y AceK.f; 17, *Escherichia fergusonii* (ATCC35469, - - - -); 18, *Escherichia albertii* (TW07627, - - - +). M, marcador de peso molecular. Tomada de Clermont *et al.*, 2013.

Tabla 8. Genotipo de la PCR cuádruplex y asignación de los filogrupos para *E. coli* (Tomado de Clermont et al., 2013).

Genotipo (PCR cuádruplex)				Filogrupo	Procedimiento
<i>arpA</i> (400 pb)	<i>chuA</i> (288 pb)	<i>yjaA</i> (211 pb)	TspE4.C2 (152 pb)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Debe ser confirmado con la búsqueda del gen <i>ibeA</i> ^a
+	-	+	-	A o C	Usar primers específicos para C, si es C+ es C, sino A
+	+	-	-	D o E	Usar primers específicos para E, si es E+ es E, sino D
+	+	-	+	D o E	Usar primers específicos para E, si es E+ es E, sino D
+	+	+	-	E o clado I	Usar primers específicos para E, si es E-, es clado I, confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	-	+	-	Clado I o II	Confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	(476) ^c	-	-	Clado III, IV o V	Confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	-	-	+	Desconocido	Realizar MLST
-	-	+	+	Desconocido	Realizar MLST
+	-	+	+	Desconocido	Realizar MLST
+	+	+	+	Desconocido	Realizar MLST
-	-	-	-	Desconocido	Confirmar identificación de <i>E. coli</i> con primers <i>uidA</i> , si es positivo confirmar usando primers de clado críptico y/o MLST

^a: Gordon y colaboradores (2008).

^b: Clermont y colaboradores (2011b).

^c: La PCR cuádruplex resultará con un producto de 476 pb en aquellas cepas que pertenezcan a los clados crípticos III, IV o V. Si esto ocurre, se deberá hacer la detección del clado críptico usando los primers correspondientes (Clermont et al., 2011b)

Tabla 9. Componentes de las PCRs y sus concentraciones, utilizados para la determinación del grupo filogenético.

Componentes y su concentración en la PCR cuádruplex (<i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y TspE4.C2)				
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción		Concentración final
Agua	-	23.45µl		-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	5µl		1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	3µl		1.5mM
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.25µl		0.05mM
Iniciador delantero (<i>chuA</i> .1b)	25µM	1µl		0.5µM
Iniciador reverso (<i>chuA</i> .2)	25µM	1µl		0.5µM
Iniciador delantero (<i>yjaA</i> .1b)	25µM	1µl		0.5µM
Iniciador reverso (<i>yjaA</i> .2b)	25µM	1µl		0.5µM
Iniciador delantero (TspE4C2.1b)	25µM	1µl		0.5µM
Iniciador reverso (TspE4C2.2b)	25µM	1µl		0.5µM
Iniciador delantero (AceK.f)	25µM	1µl		0.5µM
Iniciador reverso (ArpA1.r)	25µM	1µl		0.5µM
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.3µl		1.5 U
ADN ^a	100 ng/µl	10µl		20ng/µl
Volumen final de la reacción		50µl		
Componentes y su concentración en las PCR simples (<i>trpA</i> y <i>arpA</i> filogrupo E)				
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción		Concentración final
		Filogrupo C	Filogrupo E	
Agua		27.45µl	27.45µl	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	5µl	5µl	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	3µl	3µl	1.5mM
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.25µl	0.25µl	0.05mM
Iniciador delantero (ArpAgpE.f)	25µM	-	1µl	0.5µM
Iniciador reverso (ArpAgpE.r)	25µM	-	1µl	0.5µM
Iniciador delantero (<i>trpAgpC</i> .1)	25µM	1µl	-	0.5µM
Iniciador reverso (<i>trpAgpC</i> .2)	25µM	1µl	-	0.5µM
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.3µl	0.3µl	1.5 U
ADN ^a	100 ng/µl	10µl	10µl	20ng/µl
Volumen final de la reacción		50µl	50µl	

^a: ADN templado obtenido mediante el método de hervido y ajustado a la concentración especificada

6.15 Determinación del perfil plasmídico y caracterización parcial de los plásmidos

6.15.1 Determinación del perfil plasmídico mediante PFGE-S1

Para poder determinar la cantidad y tamaño de los plásmidos que contenían las cepas de *E. coli* se obtuvo el perfil plasmídico de las cepas mediante Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) utilizando la metodología descrita por Cortés-Cortés (Cortés-Cortés, 2016). Ver anexo 3.

Se realizó una digestión enzimática del ADN total de las cepas con la enzima nucleasa S1, para generar una conformación lineal de los plásmidos y poder separarlos mediante PFGE. Una vez realizado el corrimiento se determinó el número de los plásmidos contando el número de bandas observadas en el gel y para determinar el tamaño de los plásmidos se utilizó una regresión estadística con la movilidad relativa de los plásmidos y los tamaños de los plásmidos de la cepa de referencia NCTC 50192 que contiene 4 plásmidos de tamaño conocido (155.8, 61.3, 40.1 y 6.8 Kb), utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.03.

6.15.2 Caracterización parcial de los plásmidos

Para la caracterización parcial de los plásmidos se realizó la búsqueda de los grupos de incompatibilidad mediante la técnica de tipificación de replicón basada en PCR o PBRT (Carattoli *et al.*, 2005; García-Fernández *et al.*, 2009; Villa *et al.*, 2010), la búsqueda de las relaxasas MOB mediante el método de DPMT (Alvarado *et al.*, 2012) y la búsqueda de los SAP mediante PCR (Mnif *et al.*, 2010).

Para determinar el replicón que presentaban las cepas de *E. coli* se siguió el procedimiento de PBRT descrito por Carattoli y cols. (2005), donde se realizaron 5 PCR triplex y 3 PCR simples con los iniciadores y condiciones descritas en el anexo 2. Para este esquema se utilizaron los iniciadores actualizados por Villa y colaboradores (2010) en donde se cambia el iniciador delantero para IncFIB y los 2 iniciadores para IncFII, y que además se agregan otros iniciadores para la búsqueda de los IncFIIy, FIIs y FIIk (presentes en *Yersinia spp*, *Salmonella spp* y *Klebsiella spp* respectivamente) que se buscaron en las cepas que no presentaban IncFII.

También se realizó la búsqueda de otros replicones no considerados por el esquema de PBRT mediante PCR simples, buscando IncR, IncU, IncColE e IncColETp utilizando los iniciadores usados por García-Fernández y cols. (2009), que también se describen en el anexo 2.

Los componentes y concentraciones de las PCR triplex se muestran en la tabla 10 y los de las PCR simples fueron los mismos utilizados en la tabla 2, pero el ADN templado usado se obtuvo a través de la extracción de ADN plasmídico.

Tabla 10. Componentes de PCR triplex y sus concentraciones, utilizados para la determinación de PBRT.

Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Agua	-	5.2µl	-
Buffer 10X (Thermo Scientific)	10X	1µl	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	1µl	2.5mM
dNTPs mix (Sigma)	10mM	0.4µl	0.4mM
Iniciador delantero 1	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador reverso 1	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador delantero 2	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador reverso 2	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador delantero 3	25µM	0.3µl	0.75µM
Iniciador reverso 3	25µM	0.3µl	0.75µM
Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µl	0.1µl	0.5 U
ADN ^a	100 ng/µl	0.5µl	5ng/µl
Volumen final de la reacción		10µl	

^a: ADN templado obtenido mediante el método de extracción plasmídica y ajustado a la concentración especificada. Los pares de iniciadores usados en cada una de las PCR triplex se describen en el anexo 2

Para determinar las relaxasas presentes en las cepas se siguió el procedimiento de DPMT descrito por Alvarado y cols. (2012), en el que se realizaron PCR simples utilizando los iniciadores y condiciones descritas en el anexo 2.

Para determinar los SAP presentes en los plásmidos de las cepas se utilizaron los iniciadores usados por Mnif y cols. (2010), se realizaron PCR simples utilizando los oligonucleótidos y condiciones descritas en el anexo 2.

Para estas dos metodologías al igual que para PBRT, los componentes y sus concentraciones de las PCR fueron los mismos utilizados en la tabla 2, pero usando ADN plasmídico como templado.

6.15.3 Relación de las características plasmídicas

Para evaluar y poder visualizar mejor la relación que existe entre los replicones, las relaxasas y los SAP se realizó una gráfica de circos con la ayuda de la herramienta informática Circos (Krzywinski *et al.*, 2009): <http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/>

6.16 Evaluación de la transferencia de determinantes de resistencia

Para evaluar la transferencia de genes de resistencia mediante la transferencia horizontal de los plásmidos involucrados se realizaron ensayos de conjugación aplicando el método estandarizado en el LMHyC del ICUAP que se describe detalladamente en el anexo 3.

Las cepas de *E. coli* aisladas de los vegetales fueron las cepas donadoras en estos ensayos y la cepa *E. coli* K12 J53 resistente a rifampicina (J53Rif^R) fue usada como cepa receptora. Para la selección de las posibles cepas transconjugantes se utilizó el agar Mac Conkey + Rif (100 mg/L) + CTX (2.5 mg/L) del cual se seleccionaron 2 cepas de cada uno de los ensayos para confirmar la conjugación mediante la comparación de los perfiles plasmídicos obtenidos por PFGE-S1 (como se indica en el punto 6.15.1) y del fenotipo de resistencia (como se indica en el punto 6.3) de las cepas donadoras, la cepa receptora y de las posibles transconjugantes.

Además, se determinó cuáles fueron las relaxasas involucradas en la conjugación, así como los SAP que presentaban los plásmidos transferidos, mediante la extracción de ADN plasmídico y las metodologías descritas en el punto 6.15.2.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados del muestreo

Un total de 143 muestras de vegetales crudos, fueron obtenidas de 82 diferentes establecimientos de alimentos de la ciudad de Puebla, Puebla (localización geográfica en anexo 1), durante el periodo del 27/11/2017 al 01/04/2018. De estas muestras el 73% (n=105) se recolectó de establecimientos fijos y el 27% (n=38) restante, de establecimientos ambulantes. Los diferentes tipos de vegetales crudos analizados se muestran en la figura 4, siendo el más común la lechuga (21%); seguido del tomate (17%), cebolla con cilantro (13%) y pepino (12%), las demás muestras que se obtuvieron en menor proporción (9-1%) fueron cebolla, zanahoria, rábanos, cilantro, germinados, cebolla morada, apio, pico de gallo, espinacas, calabaza y pimiento verde, todas con un porcentaje menor al 10%. La mayoría de las muestras recolectadas fueron provenientes de establecimientos fijos (n=97) (figura 6).

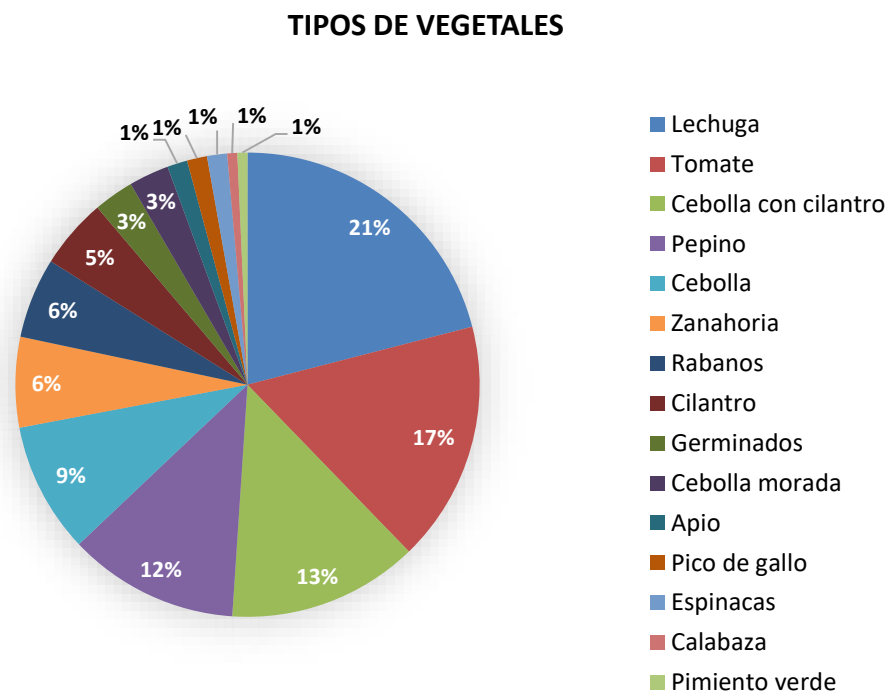


Figura 4. Tipos y proporciones de los vegetales muestreados en establecimientos de comida, fijos y ambulantes, de la Ciudad de Puebla (nov 2017-abril 2018).

7.2 Aislamiento e identificación de cepas de *E. coli*

De las 143 muestras obtenidas, 130 (91%) presentaron un crecimiento positivo en el agar Mac Conkey + CTX, observándose diferentes morfologías coloniales, de las cuales se obtuvieron 37 aislados con características macroscópicas específicas de *E. coli*, tanto en agar Mac Conkey como en Levine; las muestras 104, 122 y 134 presentaron 2 morfologías coloniales diferentes (la otra morfología colonial, presentó bordes irregulares pero con las mismas características antes descritas) pero características de *E. coli* por lo que estos aislados se tomaron en cuenta asignándole los numero 104-1, 104-2 122-1, 122-2, 134-1 y 134-2 respectivamente.

De los 37 aislados se confirmaron por pruebas bioquímicas (reportadas en el punto 6.2) 12 cepas como *E. coli*, el resto de las cepas pertenecen a los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* (n= 5, 3, y 17 respectivamente). A través de la amplificación del gen *ybbW*, se volvió a confirmar que los 12 aislados son *E. coli* (figura 5 y tabla 11); se decidió utilizar este gen para confirmar molecularmente las cepas como *E. coli* ya que es altamente incluyente para *E. coli* y altamente excluyente para otras bacterias cercanas a *E. coli* como otras especies de *Escherichia* y *Shigella* (Walker *et al.*, 2017).

De las cepas aisladas de la misma muestra que presentaron dos morfologías diferentes solo la segunda de la 122 (A122-2EC) y las dos de la 134 (A134-1EC y A134-2EC) amplificaron el gen, las que no lo amplificaron fueron descartadas del estudio.

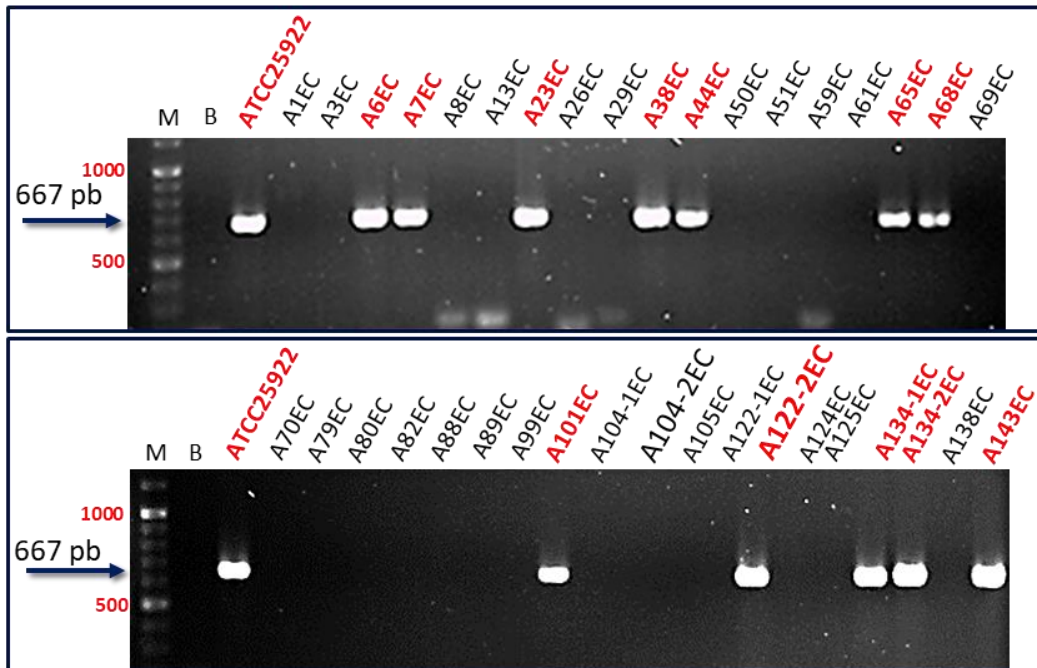


Figura 5. Identificación de *E. coli* a través de la determinación del gen *ybbW*.

En la figura se muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de las PCR para la identificación del gen *ybbW* de las 37 cepas sospechosas de *E. coli*. Como control positivo se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC25922. En rojo se muestran los aislados que presentaron un resultado positivo para la amplificación del gen *ybbW* (667 pb). M: Marcador de 100 pb (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder); B: Blanco (contiene todos los reactivos utilizados excepto ADN templado).

Tabla 11. Nomenclatura, origen y pruebas usadas en la identificación de cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos de la Cd. de Puebla.

Nombre de la cepa	Origen de muestra		Identificación	
	Vegetal	Tipo de establecimiento	Pruebas bioquímicas	<i>ybbW</i>
A6EC	Tomate	Fijo	<i>E. coli</i>	+
A7EC	Pepino	Fijo	<i>E. coli</i>	+
A23EC	Espinacas	Fijo	<i>E. coli</i>	+
A38EC	Tomate	Fijo	<i>E. coli</i> (Inactiva)	+
A44EC	Lechuga	Ambulante	<i>E. coli</i>	+
A65EC	Cilantro	Ambulante	<i>E. coli</i> (Inactiva)	+
A68EC	Cebolla con cilantro	Ambulante	<i>E. coli</i>	+
A101EC	Cebolla con cilantro	Ambulante	<i>E. coli</i>	+
A122EC*	Rábanos	Ambulante	<i>E. coli</i>	+
A134-1EC**	Cilantro	Fijo	<i>E. coli</i> (Inactiva)	+
A134-2EC**	Cilantro	Fijo	<i>E. coli</i>	+
A143EC	Cebolla con cilantro	Ambulante	<i>E. coli</i> (Inactiva)	+

*: Debido al hecho de que solo el aislado A122-2EC, de la muestra 122, se confirmó como *E. coli* se dejó el nombre de la cepa solo como A122EC. **: De la muestra 134 se logró identificar los 2 aislados como *E. coli*, incluyendo ambos para estudios posteriores.

En la figura 6 se observa el origen de donde fueron aisladas las 12 cepas de *E. coli*, mostrando un mayor aislamiento de *E. coli* a partir del cilantro y de la cebolla con cilantro, la obtención de *E. coli* de este último tipo de muestra se le atribuye al cilantro ya que de las muestras de cebolla sola no se logró aislar ninguna *E. coli*.

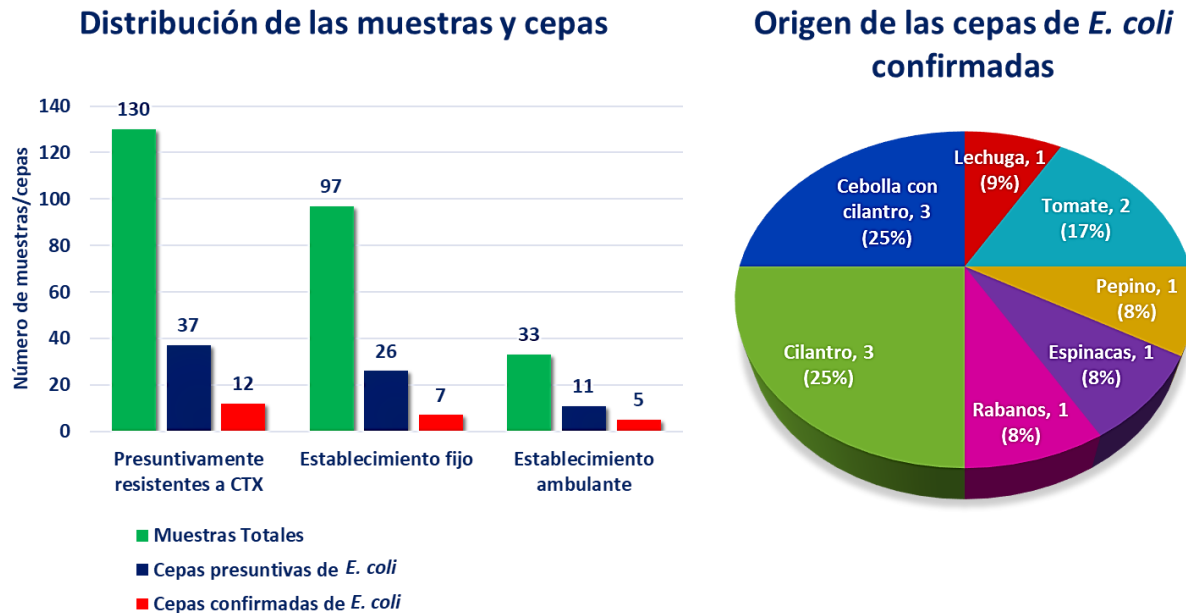


Figura 6. Distribución de las muestras de alimentos vegetales y origen de las cepas de *E. coli*.

7.3 Perfil de susceptibilidad y fenotipo BLEE de las cepas de *E. coli*

Las 12 (100%) cepas presentaron multidrogorresistencia (resistente por lo menos a 1 antibiótico de 3 o más diferentes grupos de antibióticos) (Magiorakos *et al.*, 2011). Todas las cepas presentaron una elevada resistencia a los β -lactámicos, a excepción de los carbapenémicos, a los cuales todas las cepas fueron sensibles (MEM e IMP); se observó un 100% de resistencia a AM, CXM, CTX y ATM, un 91.7% a CAZ y un 83% a FEP, solo 2 cepas (A65EC y A134-1EC) presentaron resistencia a AMC y FOX que representan el 16.7% del total (fenotipo característico de AmpC). Para el resto de los antibióticos también se presentó una elevada resistencia; para las quinolonas se observó una resistencia mayor del 67%, de igual manera para los aminoglucósidos con excepción de la AN a la cual se observó resistencia solo en 3 cepas. Para los inhibidores de las vías de síntesis de ácidos nucleicos (TMP y SXT) se observó un 41.7% de resistencia y observamos también una alta resistencia a C y TET con un 58.3% y 91.7%, respectivamente (figura 7).

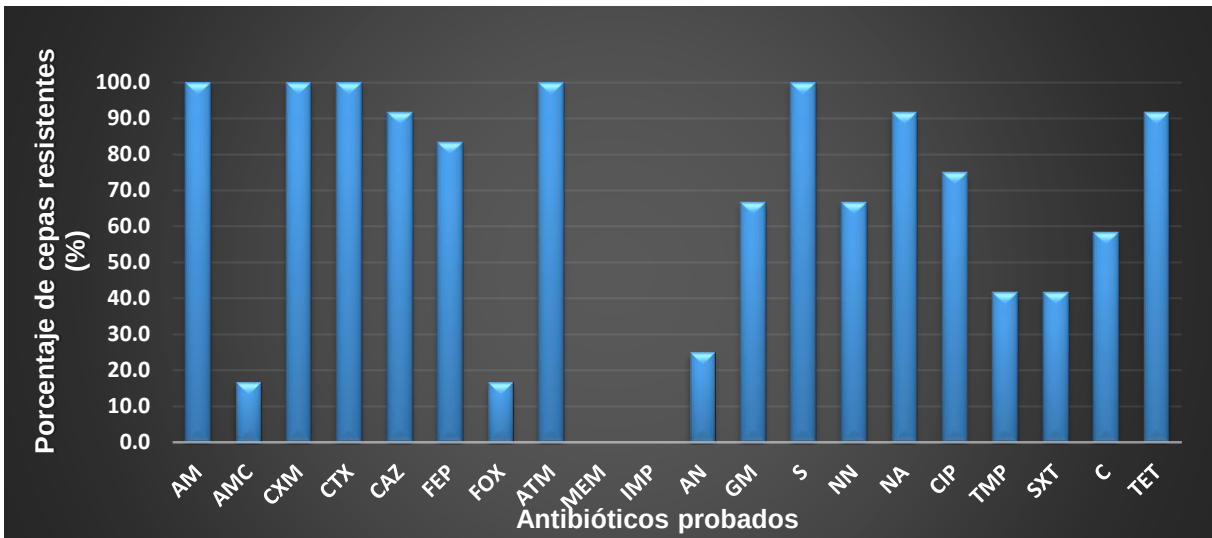


Figura 7. Perfil de resistencia de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

Porcentajes de resistencia de las cepas de *E. coli* hacia 20 antibióticos ensayados mediante el método de Kirby-Bauer (CLSI, 2018). AM: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Clavulonato; CXM: Cefuroxima; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; FOX: cefoxitina; ATM: Aztreonam; MEM: Meropenem; IMP: Imipenem; AN: Amikacina; GM: Gentamicina; S: Estreptomicina; NN: Tobramicina; NA: Ácido Nalidixico; CIP: Ciprofloxacino; TMP: Trimetoprim; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol; C: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina.

Los resultados de la producción fenotípica de BLEE mostraron que 10 de las 12 cepas presentan un fenotipo BLEE por ambas metodologías probadas (figura 8); las 2 cepas que no presentaron un fenotipo BLEE fueron A65EC y A134-1EC las cuales presentaban un perfil de resistencia característico de la presencia de AmpC.

La tabla 12 muestra el resumen de los resultados obtenidos del perfil de resistencia y el fenotipo BLEE de las 12 cepas del estudio.

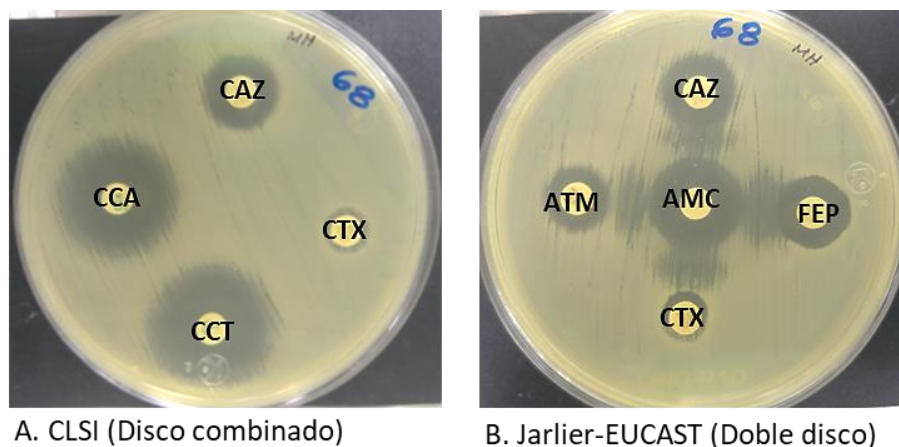


Figura 8. Imagen del resultado de la determinación del fenotipo BLEE usando las metodologías CLSI y EUCAST. Se observa que la cepa A68EC presenta un fenotipo BLEE positivo para ambas metodologías. A: método de disco combinado propuesto por el CLSI. B: método de doble disco propuesto por el EUCAST.

Tabla 12. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos y fenotipo BLEE de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

		ANTIBIÓTICOS	CEPAS DE <i>E. coli</i>													TOTAL Resistentes	% Resistentes
			A6EC	A7EC	A23EC	A38EC	A44EC	A65EC	A68EC	A101EC	A122-2EC	A134-1EC	A134-2EC	A143EC			
FENOTIPO DE RESISTENCIA		AM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	100.0	
		AMC	S	S	I	S	S	R	S	S	I	R	I	I	2	16.7	
		CXM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	100.0	
		CTX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	100.0	
		CAZ	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	11	91.7	
		FEP	R	R	R	R	R	SDD	R	R	R	SDD	R	R	10	83.3	
		FOX	I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	2	16.7	
		ATM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	100.0	
		MEM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0.0	
		IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0.0	
		AN	S	S	I	S	S	I	I	R	R	I	R	I	3	25.0	
		GM	I	R	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	8	66.7	
		S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	100.0	
		NN	I	R	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	8	66.7	
		NA	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	11	91.7	
		CIP	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	9	75.0	
		TMP	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	5	41.7	
		SXT	R	I	S	R	S	R	S	I	I	R	I	R	5	41.7	
		C	R	R	S	R	S	I	R	S	S	R	R	R	7	58.3	
		TET	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	11	91.7	
FENOTIPO BLEE	Disco combinado (Halo en mm) CLSI	CTX	0	0	0	0	10	14	0	0	0	17	0	10			
		CCT	20	23	24	23	27	15	23	25	24	20	25	27			
		CAZ	13	14	15	15	16	13	14	15	14	15	14	19			
		CCA	25	24	23	20	23	14	22	23	21	19	23	26			
	Doble disco (Sinergismo con AMC) EUCAST	BLEE	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	10	83.3	
		CTX	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+			
		CAZ	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+			
		FEP	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+			
	ATM	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+				
	BLEE	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	10	83.3		

R: Resistente; S: Sensible; I: Intermedio; SSD: Sensible Dependiente de Dosis. Las abreviaciones de los antibióticos se pueden revisar en la tabla 3.

7.4 Identificación de genes que codifican para BLEE y β -lactamasas AmpC

Se buscaron los genes que codifican para las BLEE más comunes en *E. coli*: *bla*_{CTX-M} (876 pb), *bla*_{TEM} (861 pb), *bla*_{SHV} (861 pb), *bla*_{OXA} (831 pb) y la β -lactamasa tipo AmpC *bla*_{CMY} (1146 pb) en las 12 cepas ya que todas presentaron una resistencia muy alta a los β -lactámicos, aunque 2 cepas no presentaron un fenotipo BLEE. De las 12 cepas, las 10 cepas con un fenotipo BLEE positivo, presentaron el gen *bla*_{CTX-M} y las 2 cepas con fenotipo BLEE negativo, presentaron *bla*_{CMY}; el gen *bla*_{TEM} estuvo presente en 5 cepas, 4 de ellas con fenotipo BLEE positivo y la otra con fenotipo BLEE negativo (A65EC) que portaba *bla*_{CMY}; el gen *bla*_{OXA} se encontró en solo una cepa (A23EC) y el gen *bla*_{SHV} no se encontró en ninguna de las cepas.

En la figura 9 se muestra el porcentaje en el que se encontraron los genes de las enzimas identificadas y en la tabla 13 se muestran cuáles fueron los genes identificados en cada cepa.

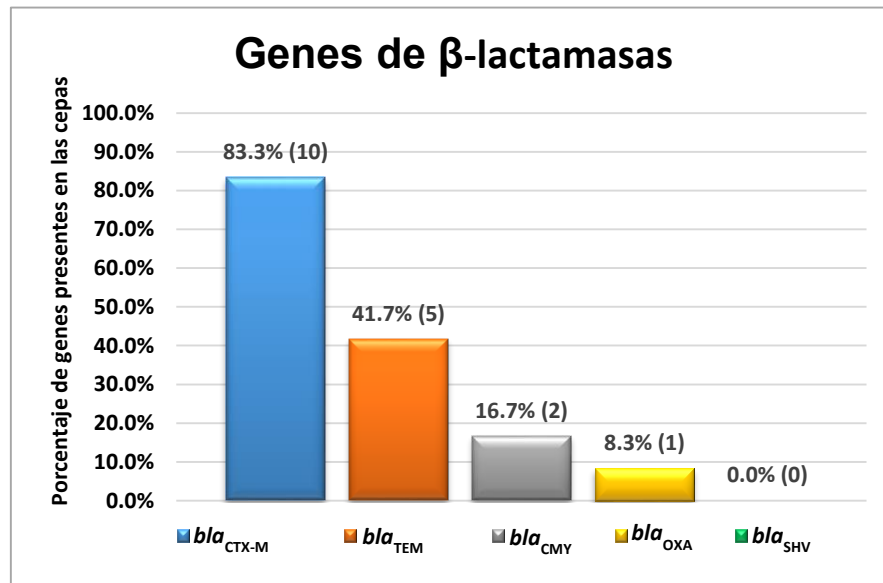


Figura 9. Porcentaje de los genes de las β-lactamasas presentes en las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

Tabla 13. Resultado de la determinación de los genes BLEE y CMY en las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

Cepa	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CMY}	<i>bla</i> _{CTX-M}	Total de genes
A6EC	-	-	-	-	+	1
A7EC	-	-	-	-	+	1
A23EC	-	-	-	-	+	1
A38EC	+	+	-	-	+	3
A44EC	+	-	-	-	+	2
A65EC	+	-	-	+	-	2
A68EC	-	-	-	-	+	1
A101EC	-	-	-	-	+	1
A122EC	+	-	-	-	+	2
A134-1EC	-	-	-	+	-	1
A134-2EC	-	-	-	-	+	1
A143EC	+	-	-	-	+	2

En letras rojas se muestran las cepas con fenotipo BLEE negativo (A65EC y A134-1EC).

De las 10 cepas que presentaron *bla*_{CTX-M}, se procedió a la determinación del grupo y de la variante *bla*_{CTX-M-15} por PCR (figura 10); además, se secuenciaron estos genes para poder determinar la variante correcta de cada una de estos genes, mediante la comparación de las secuencias con los genes de referencia de la base de datos del NCBI (BARRGD). Los resultados se muestran en la tabla 14, observándose que las variantes presentes en estas cepas son *bla*_{CTX-M-55} (n=6) y *bla*_{CTX-M-15} (n=4).

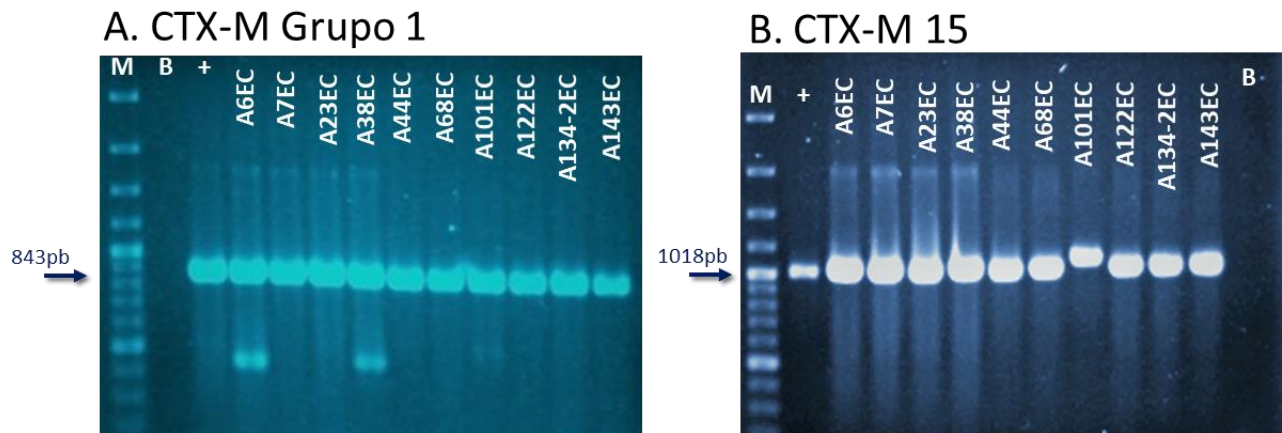


Figura 10. Determinación de los genes que codifican para los genes *bla*_{CTX-M} (grupo 1) y *bla*_{CTX-M-15} en cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.
Electroforesis en geles de agarosa al 1% de los corrimientos electroforéticos de las PCR de *bla*_{CTX-M G1} y *bla*_{CTX-M-15}. A. Imagen del corrimiento de la PCR de *bla*_{CTX-M G1}. B. Imagen del corrimiento de la PCR de *bla*_{CTX-M-15} para determinar presuntivamente la presencia de esta variante.

Tabla 14. Identificación del grupo y variante del gen *bla*_{CTX-M} en las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

Cepa	<i>bla</i> _{CTX-M G1}	<i>bla</i> _{CTX-M G2}	<i>bla</i> _{CTX-M G8}	<i>bla</i> _{CTX-M G9}	<i>bla</i> _{CTX-M 15}	Variante de <i>bla</i> _{CTX-M}
A6EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
A7EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
A23EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
A38EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
A44EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
A65EC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A68EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
A101EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
A122EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
A134-1EC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A134-2EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-55}
A143EC	+	-	-	-	+	<i>bla</i> _{CTX-M-55}

ND: No Determinado. Las cepas A65EC y A134-1EC como no fueron portadoras de CTX-M no se incluyeron en esta parte del estudio.

7.5 Identificación de genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas

Se buscaron los genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas en las 12 cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos. De todos los genes buscados mediante PCR se logró encontrar los genes *qnrB* y *aac(6')-Ib* en 5 y 1 cepas respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 11.

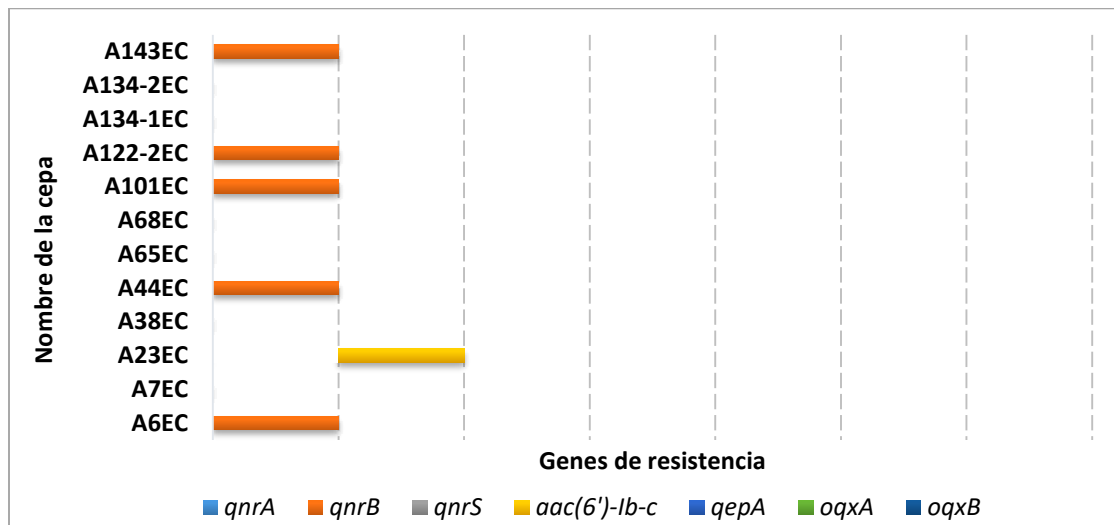


Figura 11. Gráfica de los genes plasmídicos involucrados en la resistencia a quinolonas presentes en las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

7.6 Identificación de genes asociados a la resistencia a tetraciclinas, aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfonamidas y trimetoprim

Se identificaron los genes asociados a la resistencia hacia los demás grupos de antibióticos mediante PCR de las 12 cepas de *E. coli* aisladas de los vegetales crudos. El gen más común presente en las cepas fue *tetA* (75%), seguido de *aac(3')-II*, *sul3* y *addA* presentes en un 58.3% de las cepas cada uno; en menor proporción se encontró *dfrA1/5/14* con un 25%, *sul1*, *dfrA12* y *drfA7/17* con un 16.7% cada uno, *catA* en una sola cepa (8.3%) y los genes *tetB*, *cmIA* y *dfrB* no se encontraron en ninguna cepa. Los genes presentes en cada cepa se muestran en la figura 12.

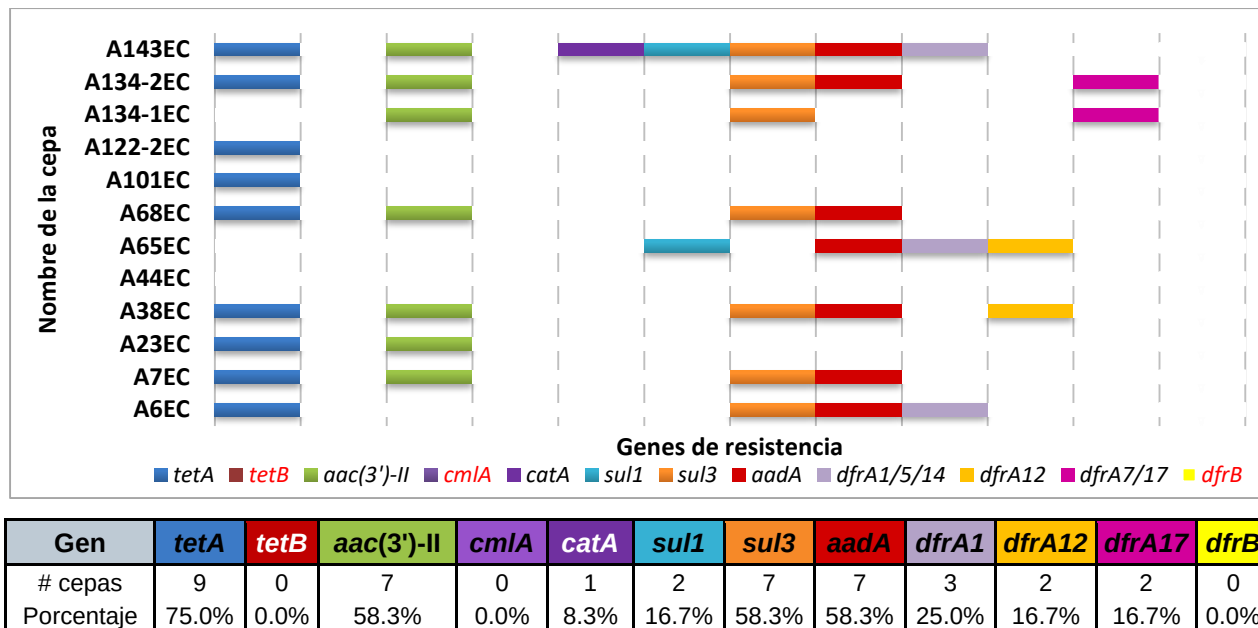


Figura 12. Gráfica de los genes asociados a la resistencia a los demás grupos de antibióticos presentes en las cepas de *E. coli*.

La tabla de la figura muestra el total y porcentaje de los genes encontrados en las cepas de *E. coli*.

7.7 Determinación del serotipo, patotipo, virotipo y filogruppo de las cepas de *E. coli*

7.7.1 Serotipo de las cepas de *E. coli*

Se determinó el serotipo de las 12 cepas de *E. coli* con la colaboración del D.C. Armando Navarro Ocaña de la UNAM. Se logró asociar a 2 serotipos a cepas patógenas, el serotipo O25:H4 de la cepa A23EC que se asocia a UPEC y el serotipo O157:H- de la cepa A134-2EC que se asocia a EHEC, el resto de las cepas presentó un serotipo asociado con cepas comensales (Rodríguez, 2002; Wiles *et al.*, 2008; Sainz *et al.*, 2008) (tabla 15).

Tabla 15. Serotipos de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

Cepa	Antígeno O	Antígeno H
A6EC	O100	H34
A7EC	O120	H10
A23EC	O25	H4
A38EC	O34	H-
A44EC	O78	H9
A65EC	O?	H-
A68EC	O20	H9
A101EC	O162	H10
A122-2EC	O78	H9
A134-1EC	O21	H10
A134-2EC	O157	H-
A143EC	O86	H47

O?: No se pudo determinar el serogrupo con los anticuerpos con los que contaba el laboratorio; H-: cepas inmóviles

7.7.2 Patotipo de las cepas de *E. coli*

El patotipo de las 12 cepas de *E. coli* se determinó mediante PCR y ninguna cepa posee alguno de los genes específicos de alguna categoría de los patotipos DEC (descritos en el punto 6.12), por lo que ninguna de las cepas fue clasificada como diarreogénica. Debido a estos resultados, se procedió a la búsqueda de PAIs características de cepas prototipo de UPEC (Sabaté *et al.*, 2006), estos resultados mostraron que las 12 cepas portan la PAI-II_{CFT073}, además las cepas A68EC y A134-2EC presentaron la PAI-IV₅₃₆ y la cepa A23EC presentó 2 PAIs de la cepa CFT073 (PAI-I_{CFT073} y PAI-II_{CFT073}) y 2 PAIs de la cepa 536 (PAI-II₅₃₆ y PAI-IV₅₃₆), siendo esta cepa la que portaba más PAIs. Los resultados de cada cepa se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Determinación de las PAIs de cepas prototipo de UPEC, de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos (Sabaté *et al.*, 2006).

CEPA	CFT073		J96		536			
	PAI-I	PAI-II	PAI-I	PAI-II	PAI-I	PAI-II	PAI-III	PAI-IV
A6EC	-	+	-	-	-	-	-	-
A7EC	-	+	-	-	-	-	-	-
A23EC	+	+	-	-	-	+	-	+
A38EC	-	+	-	-	-	-	-	-
A44EC	-	+	-	-	-	-	-	-
A65EC	-	+	-	-	-	-	-	-
A68EC	-	+	-	-	-	-	-	+
A101EC	-	+	-	-	-	-	-	-
A122EC	-	+	-	-	-	-	-	-
A134-1EC	-	+	-	-	-	-	-	-
A134-2EC	-	+	-	-	-	-	-	+
A143EC	-	+	-	-	-	-	-	-

En los recuadros rojos se indican las PAI positivas

7.7.3 Determinación del virotipo de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos

Se determinó el virotipo de las 12 cepas de *E. coli*, basado en el esquema de virotipificación propuesto por Barrios-Villa y cols. (2018) que está dirigido a la caracterización de las cepas UPEC O25:H4 ST131, observándose que la mitad de las cepas no presentó algún factor de virulencia incluido en el esquema por lo que fueron

designados como virotipo 0. El virotipo más común fue el A (5 cepas) que presenta solamente el factor de virulencia *iroN*; la cepa A23EC fue la que presentó más factores de virulencia (*iroN*, *sat*, *papGII* y *cnf1*) y de acuerdo al esquema de virotipificación no se pudo clasificar por este método, por lo que se le asignó un nuevo virotipo denominado H. Los virotipos de las cepas se pueden observar en la tabla 17.

Tabla 17. Determinación del Virotipo de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos siguiendo el esquema propuesto por Barrios-Villa para UPEC O25:H4 ST131.

Cepas	Factores de virulencia											Virotipo
	<i>afa/draBC</i>	Operón <i>afa</i>	<i>iroN</i>	<i>sat</i>	<i>ibeA</i>	<i>papGII</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGIII</i>	<i>cdtB</i>	<i>neuC</i>	
A6EC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A
A7EC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A
A23EC	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	H*
A38EC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A
A44EC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A
A65EC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
A68EC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
A101EC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
A122-2EC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A
A134-1EC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
A134-2EC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
A143EC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

afa/draBC: adhesina Afa/Dr; operón *afa*: FM955459; *iroN*: receptor sideróforo catecolato; *sat*: toxina autotransportadora secretada; *ibeA*: proteína de invasión a epitelio cerebral; *papGII*: alelo II del gen *papG*; *cnf1*: factor citotóxico necrotizante tipo 1; *hlyA*: alfa-hemolisina; *papGIII*: alelo III del gen *papG*; *cdtB*: toxina de distensión citoletal; *neuC*-K1: variante K1 de la cápsula del grupo II.

7.7.4 Determinación de filogrupos de las cepas de *E. coli*

El filogrupo de las 12 cepas de *E. coli* se determinó por el método de Clermont, los resultados mostraron que el 50% (n=6) pertenecen al filogrupo A, el 33% (n=4) al B1, el 8% (n=1) al B2 y 8% (n=1) al clado 1 o 2 (figura 13). La tabla 18 muestra el filogrupo de cada una de las cepas.

Con estos resultados se pudo determinar que la cepa A23EC es una cepa que pertenece al patotipo UPEC debido a que fue la única que presentó las 2 PAIs de la cepa CFT073 y 2 de la 536, un serotipo O25:H4 y filogrupo B2, además de presentar un nuevo virotipo H que presenta 4 factores de virulencia. El resto de las cepas se consideraron como cepas comensales, pero MDR.

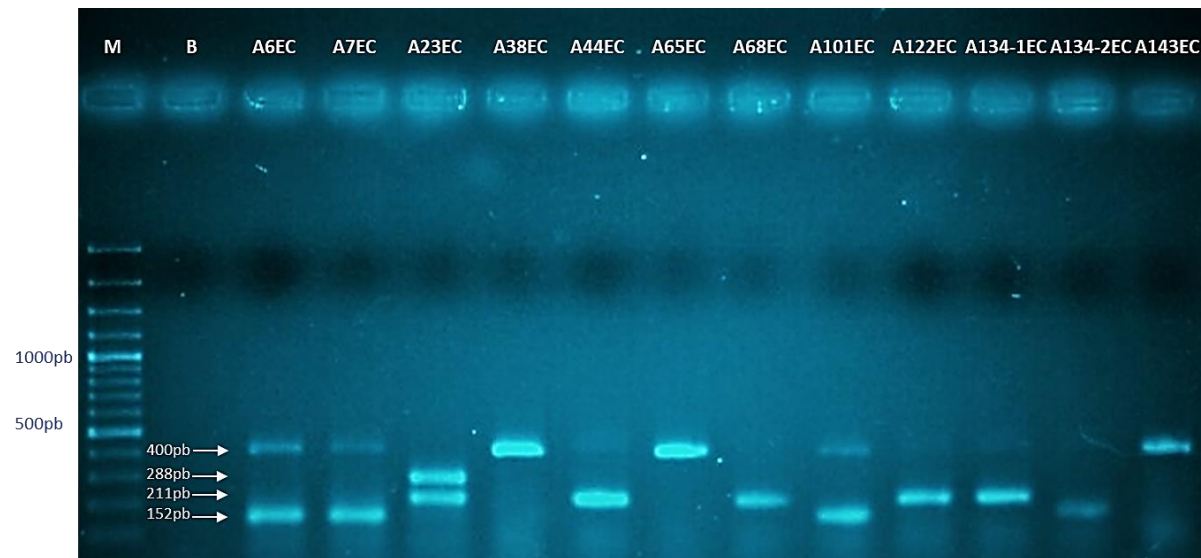


Figura 13. Imagen del corrimiento electroforético de la PCR cuádruplex para determinar el filogrupo.
Tamaño de los amplificados: *arpA* = 400pb; *chuA* = 288pb; *yjaA* = 211pb; TspE4.C2 = 152 pb

Tabla 18. Determinación del filogrupo de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

CEPA	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	<i>trpA</i>	Filogrupo
A6EC	+	-	-	+	ND	B1
A7EC	+	-	-	+	ND	B1
A23EC	-	+	+	-	ND	B2
A38EC	+	-	-	-	ND	A
A44EC	+	-	+	-	-	A
A65EC	+	-	-	-	ND	A
A68EC	-	-	+	-	ND	Clado 1 o 2
A101EC	+	-	-	+	ND	B1
A122-2EC	+	-	+	-	-	A
A134-1EC	+	-	+	-	-	A
A134-2EC	+	-	-	+	ND	B1
A143EC	+	-	-	-	ND	A

ND: No Determinado. *arpA*: regulador de acetil-CoA sintasa; *chuA*: receptor de hemina; *yjaA*: proteína de respuesta al estrés; TspE4.C2: lipasa esterasa; *trpA*: subunidad a de triptófano sintasa

En la tabla 19 se muestra el resumen de las características filogenéticas, fenotípicas y genotípicas de resistencia y virulencia de las 12 cepas de *E. coli*.

Tabla 19. Características filogenéticas, fenotípicas y genotípicas (de resistencia y virulencia) de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.

Cepa/Origen	Filogrupo	Serotipo	Virotipo	No. PAIs	Resistencia a no β-lactámicos	Resistencia AMC/FOX	Fenotipo BLEE	Genes de resistencia
A6EC/T*	B1	O100:H34	A	1	S, NA, CIP, TMP, SXT, C, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M55/79} , <i>qnrB</i> , <i>tetA</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA</i> , <i>dfrA1/5/14</i>
A7EC/P*	B1	O120:H10	A	1	GM, S, NN, NA, CIP, C, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M55/79} , <i>tetA</i> , <i>aac(3')-II</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA</i>
A23EC/E*	B2	O25:H4	H	4	GM, S, NN, NA, CIP, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>aac(6')-Ib-C</i> , <i>tetA</i> , <i>aac(3')-II</i>
A38EC/T*	A	O34:H-	A	1	GM, S, NN, NA, CIP, TMP, SXT, C, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M55/79} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>aac(3')-II</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA</i> , <i>dfrA12</i>
A44EC/L**	A	O78:H9	A	1	S, NA	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>qnrB</i>
A65EC/C**	A	O?:H-	0	1	S, TMP, SXT, TET	+/+	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY} , <i>sul1</i> , <i>aadA</i> , <i>dfrA1/5/14</i> , <i>dfrA12</i>
A68EC/CC**	Clado 1 o 2	O20:H9	0	2	GM, S, NN, NA, CIP, C, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M55} , <i>tetA</i> , <i>aac(3')-II</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA</i>
A101EC/CC**	B1	O162:H10	0	1	AN, GM, S, NN, NA, CIP, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>qnrB</i> , <i>tetA</i>
A122EC/R**	A	O78:H9	A	1	AN, S, NA, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>qnrB</i> , <i>tetA</i>
A134-1EC/C*	A	O21:H10	0	1	GM, S, NN, NA, CIP, TMP, SXT, C, TET	+/+	-	<i>bla</i> _{CMY} , <i>tetA</i> , <i>aac(3')-II</i> , <i>sul3</i> , <i>dfrA7/17</i>
A134-2EC/C*	B1	O157:H-	0	2	AN, GM, S, NN, NA, CIP, C, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M55} , <i>tetA</i> , <i>aac(3')-II</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA</i> , <i>dfrA7/17</i>
A143EC/CC*	A	O86:H47	0	1	GM, S, NN, NA, CIP, TMP, SXT, C, TET	-/-	+	<i>bla</i> _{CTX-M55} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>qnrB</i> , <i>tetA</i> , <i>aac(3')-II</i> , <i>sul1</i> , <i>sul3</i> , <i>catA</i> , <i>aadA</i> , <i>dfrA1/5/14</i>

T: Tomate; P: Pepino; E: Espinacas; L: Lechuga; C: Cilantro; CC: Cebolla con cilantro; R: Rábanos; *: Establecimiento fijo; **: Establecimiento ambulante; 1: PAI-II_{CFT073}; 2: PAI-II_{CFT073} y PAI-IV₅₃₆; 4: PAI-I_{CFT073}, PAI-II_{CFT073}, PAI-III₅₃₆, PAI-IV₅₃₆; AN: Amikacina; GM: Gentamicina; S: Estreptomicina; NN: Tobramicina; NA: Ácido Nalidixico; CIP: Ciprofloxacino; TMP: Trimetoprim; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol; C: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina; AMC: Amoxicilina + Clavulonato; FOX: cefoxitina. Todas las cepas presentaron elevada resistencia a β-lactámicos.

7.8 Determinación del perfil plasmídico de las cepas de *E. coli* y caracterización parcial de los plásmidos involucrados en la resistencia.

7.8.1 Perfil plasmídico de las cepas de *E. coli*

La determinación del perfil plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina y mediante PFGE+S1, los perfiles plasmídicos de las cepas se muestran en las figuras 14 y 15 respectivamente. Se observó una gran cantidad de plásmidos en las cepas con un promedio de 3 bandas plasmídicas por cepa (rango de 1 – 6), en general se presentaron en mayor número bandas plasmídicas de 100 kb aprox. Los tamaños de las bandas plasmídicas se estimaron únicamente del perfil plasmídico obtenido de PFGE+S1, mediante regresión lineal de acuerdo a su movilidad relativa comparada con aquella de la cepa de referencia NCTC 50192, la metodología y resultados estadísticos se pueden ver en el anexo 4, el número de plásmidos y sus tamaños se muestran en la tabla 20. El número de bandas observados con las dos técnicas no concuerdan debido a que por la metodología de lisis alcalina obtenemos diferentes isoformas de los plásmidos por lo que observamos una mayor cantidad de bandas.

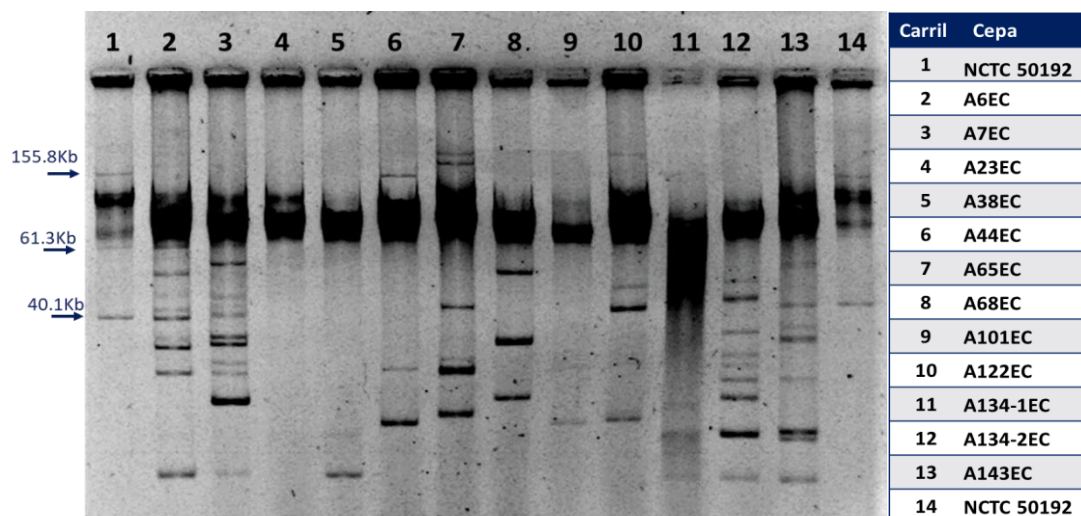


Figura 14. Perfil plasmídico de las cepas de *E. coli* obtenido mediante extracción plasmídica por lisis alcalina.

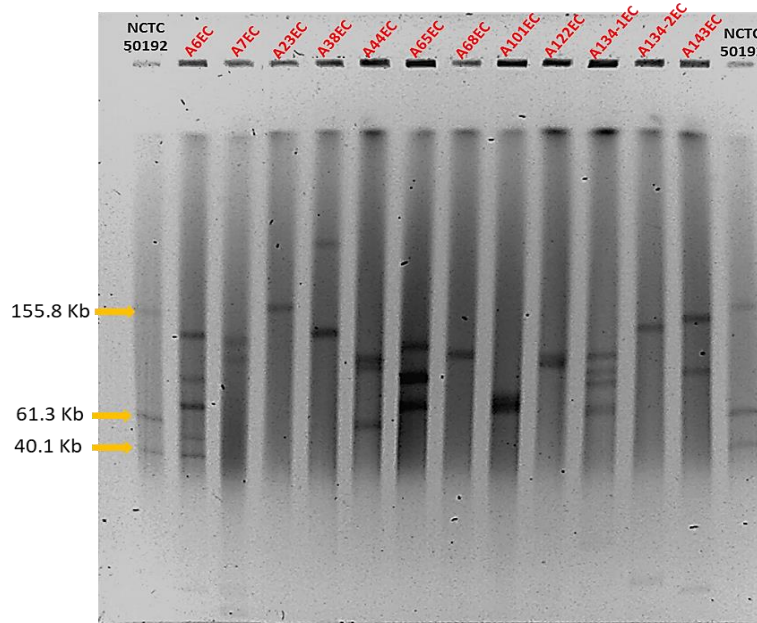


Figura 15. Perfil plasmídico de las cepas de *E. coli* obtenido mediante Electroforesis de Campos Pulsados con la enzima S1. Cepa control: NCTC 50192

7.8.2 Caracterización de los plásmidos de las cepas de *E. coli*

De los resultados de la caracterización de los plásmidos de las cepas de *E. coli* se encontró en mayor proporción replicones IncFII ($n=11$), seguido de IncFIB ($n=10$), los replicones IncColE e IncColETp se encontraron en 8 y 6 cepas respectivamente, los demás replicones se encontraron en menor proporción, identificándose IncI1 e IncY en 2 cepas cada uno e IncFIA, IncFIC e IncA/C en 1 cepa cada uno (figura 16 y 19); en promedio se identificaron 4 grupos de incompatibilidad plasmídica por cepa, aun y cuando se encontraban pocos plásmidos como en la cepa A23EC que presenta 4 replicones y solo es portadora de 1 plásmido.

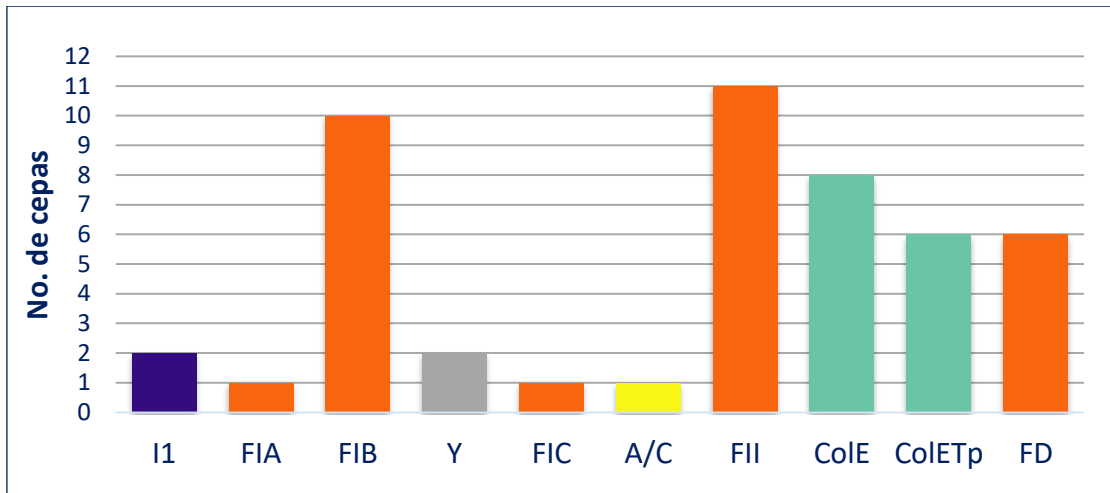


Figura 16. Grupos de Incompatibilidad plasmídica presentes en las cepas de *E. coli*

La relaxasa MOB más común fue F12 (n=10), seguida de P51 (n=5) y en menor proporción se presentaron P12 y Qu presentes en 2 cepas cada una, P3 y Q11 presentes en 1 cepa cada una (figura 17 y 19). En general las cepas presentaban de 1 a 2 relaxasas distintas, en el caso de la cepa A6EC se identificaron 4 relaxasas, siendo esta cepa la que portó la mayor cantidad de plásmidos (n=6); y en el caso de la cepa A44EC que posee 3 plásmidos, pero en la cual no se pudo identificar ninguna relaxasa por esta metodología debido a que este esquema no incluye todas las relaxasas que se pueden encontrar en los plásmidos y que posiblemente no se han descrito previamente.

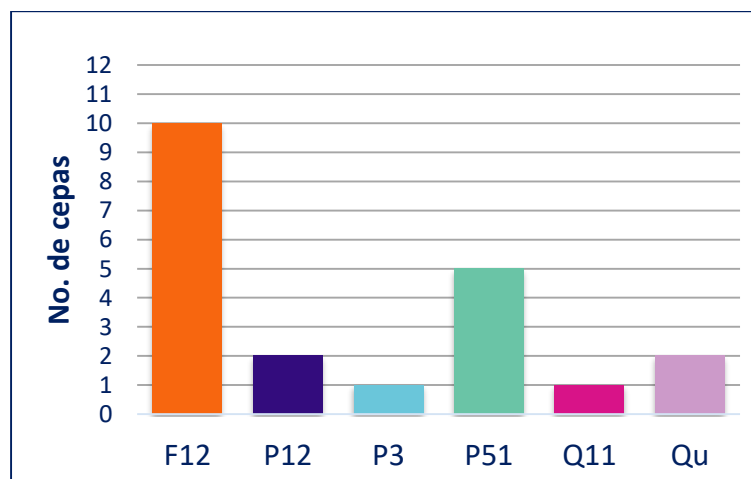


Figura 17. Relaxasas presentes en las cepas de *E. coli*

En la búsqueda de los SAP se logró identificar una gran cantidad de estos en las cepas, en promedio presentaron de 3 a 4 sistemas por cepa, a excepción de las cepas A44EC y A122EC que solo presentaron el sistema *relBE*; los SAP más comunes fueron *relBE* (n=11) seguido de *srnBC* (n=9), *pemKI* (n=8) y *hok-sok* (n=7), y en menor medida se presentaron *ccdAB*, *vagCD* y *pndAC* (n=3 cepas por cada uno), y *parDE* que solo se encontró en una cepa (figura 18 y 19).

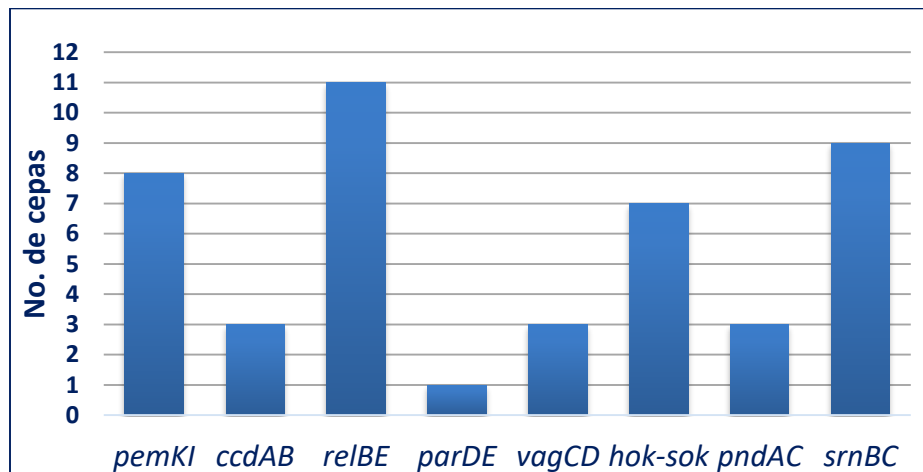


Figura 18. Sistemas de adicción de los plásmidos presentes en cepas de *E. coli*

hok-sok: host killing system; *pndAC*: promotion of nucleic acid degradation; *srnBC*: stable RNA; *pemKI*: plasmid emergency maintenance; *parDE*: partitioning system; *relBE*: relaxed control of stable RNA synthesis; *ccdAB*: coupled cell division locus; *vagCD* virulence-associated protein.

En la tabla 20 se muestra el resumen de las características plasmídicas de las cepas respecto a la determinación de los replicones, relaxasas y SAP presentes en cada cepa y en la figura 19 se puede observar las proporciones y distribución de los grupos de incompatibilidad, de las relaxasas y de los SAP en las 12 cepas de *E. coli*; donde se observa una gran distribución de IncF y relaxasas MOB-F en las cepas, así como una gran cantidad de SAP, siendo el más frecuente el sistema *relBE*.

Tabla 20. Características plasmídicas presentes en las cepas de *E. coli*.

Cepa	# Plásmidos:Tamaño (kb)	Replicón	Relaxasa	SAP
A6EC	6: 126.2, 87.2, 65.4, 44.1, <40.1, <40.1	FIB, FII, ColE, ColETp	F12, P3, P51	<i>pemKI, relBE, parDE, hok-sok, srnBC</i>
A7EC	4: 120.1, 104.3, <40.1, <40.1	FIB, FII, ColE	F12,P51, Qu	<i>pemKI, relBE, hok-sok, srnBC</i>
A23EC	1: 154	FIA, FIB, FII, A/C	F12, Q11	<i>pemKI, ccdAB, relBE, vagCD, pndAC, srnBC</i>
A38EC	2: 235.8, 126.8	FIB, FII	F12	<i>pemKI, relBE, hok-sok, srnBC</i>
A44EC	3: 103.2, 95.8, 52	FIB, FII, Y, ColETp	-	<i>relBE</i>
A65EC	3: 115.2, 85.8, 65.4	I1, FII, ColE	F12, P12,	<i>relBE, vagCD, pndAC</i>
A68EC	2: 106.8, <40.1	FIB, FII, ColE	F12	<i>pemKI, relBE, hok-sok, srnBC</i>
A101EC	2: 70.8, 64.2	FIB, FIC, FII, ColETp	F12	<i>ccdAB, relBE, hok-sok, srnBC</i>
A122EC	2: 99.7, <40.1	FIB, Y, ColE, ColETp	P51	<i>relBE</i>
A134-1EC	5: 106.8, 94.3, 83, 63, <40.1	I1, FII, ColE, ColETp	F12, P12	<i>pemKI, ccdAB, relBE, vagCD, pndAC, srnBC</i>
A134-2EC	2: 133.6, <40.1	FIB, FII, ColE	F12, P51, Qu	<i>pemKI, relBE, hok-sok, srnBC</i>
A143EC	3: 144.2, 93.3, <40.1	FIB, FII, ColE, ColETp	F12, P51	<i>pemKI, hok-sok, srnBC</i>

El número y tamaño de los plásmidos se determinó mediante regresión simple usando el gel de PFGE+S1 (figura 15)

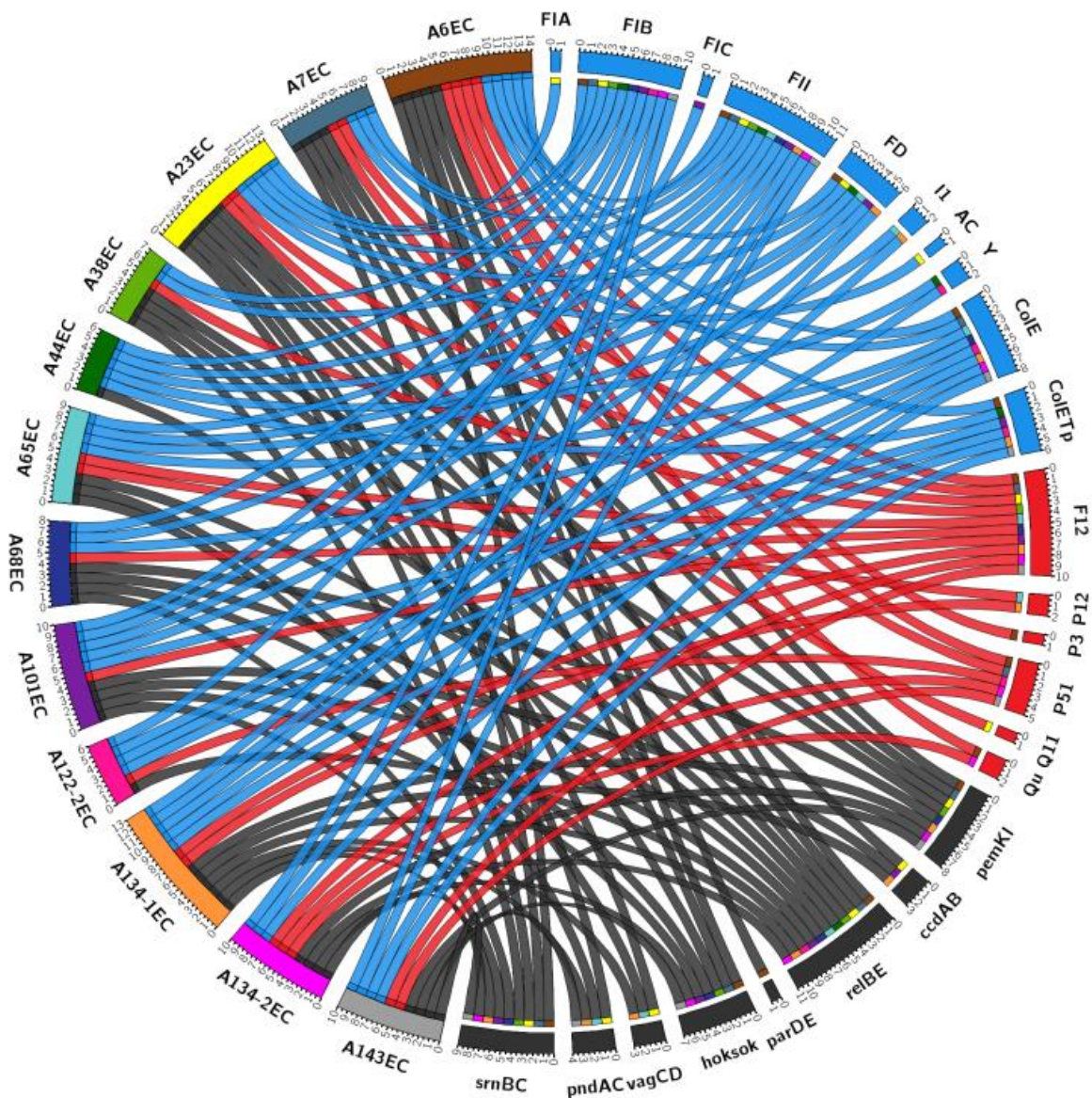


Figura 19. Representación gráfica de Circos de la relación entre las características plasmídicas y las cepas de *E. coli*.

En el lado izquierdo del círculo en el gráfico se encuentran las 12 cepas de estudio representadas por un color distinto cada una, en el lado derecho del círculo en el gráfico se encuentran las características plasmídicas: Replicones (listones en color azul), Relaxasas (listones en color rojo) y SAP (listones en color negro). Para cada una de las cepas se puede observar por el color de los listones (azul, rojo y negro) la característica y la clasificación que le confiere cada listón.

7.9 Evaluación de la transferencia de determinantes de resistencia.

De los ensayos de conjugación para evaluar la transferencia de determinantes de resistencia se logró obtener clonas transconjugantes en Agar Mac Conkey + CTX + Rif para las 12 cepas. Se recuperaron 2 posibles cepas transconjugantes de cada una de las cepas donadoras y se evaluó su perfil plasmídico mediante PFGE+S1, comparándolo con, tanto con el de las cepas donadora, como el de la cepa receptora (figura 21). Se observó que solo 8 cepas donadoras fueron capaces de transferir plásmidos (indicados en la figura 21) mediante conjugación; estas cepas transconjugantes presentaron un perfil plasmídico distinto al de las cepas donadoras y receptora, además de un fenotipo de resistencia distinto al de las cepas donadoras y receptora, adquiriendo resistencia principalmente a β -lactámicos y un fenotipo BLEE.

Las otras 4 cepas donadoras no lograron transferir plásmidos mediante conjugación ya que las posibles cepas transconjugantes obtenidas, presentaban el mismo perfil plasmídico, así como el fenotipo de resistencia, que el de las cepas donadoras, sugiriendo que posiblemente estas cepas eran las mismas cepas donadoras que lograron adaptarse a la rifampicina usada para seleccionar las cepas transconjugantes (figura 20).

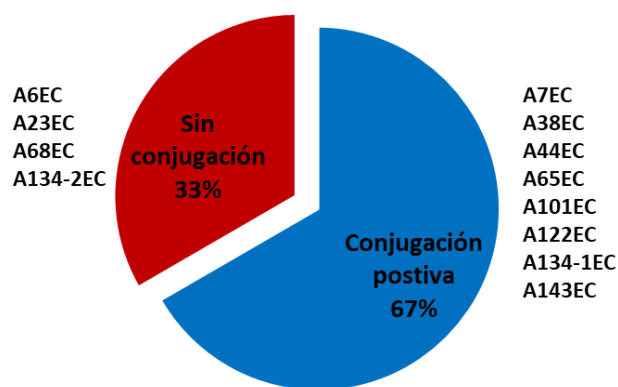
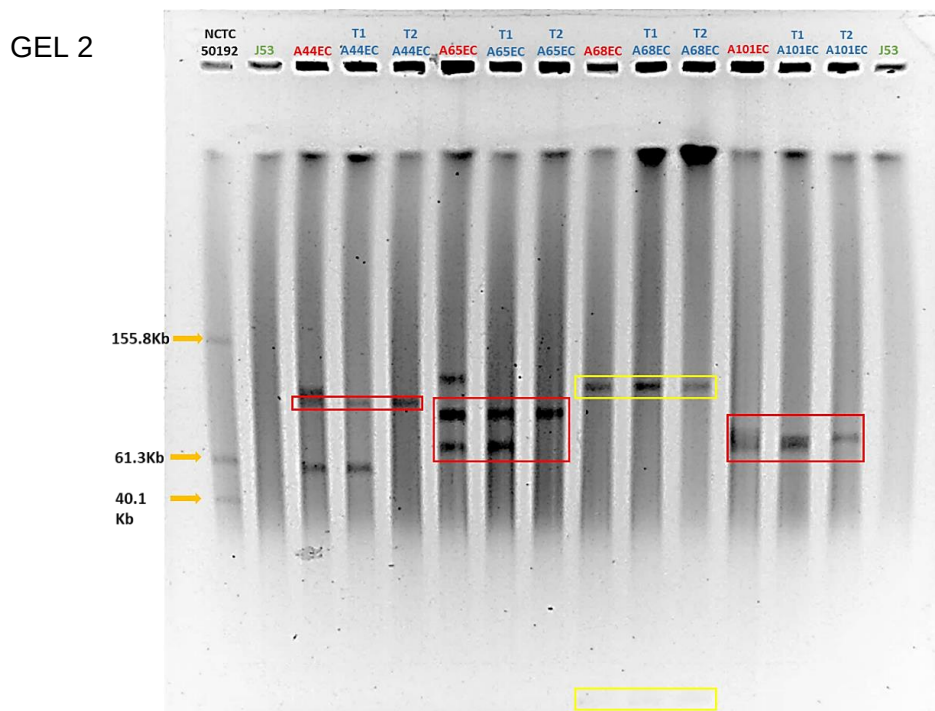
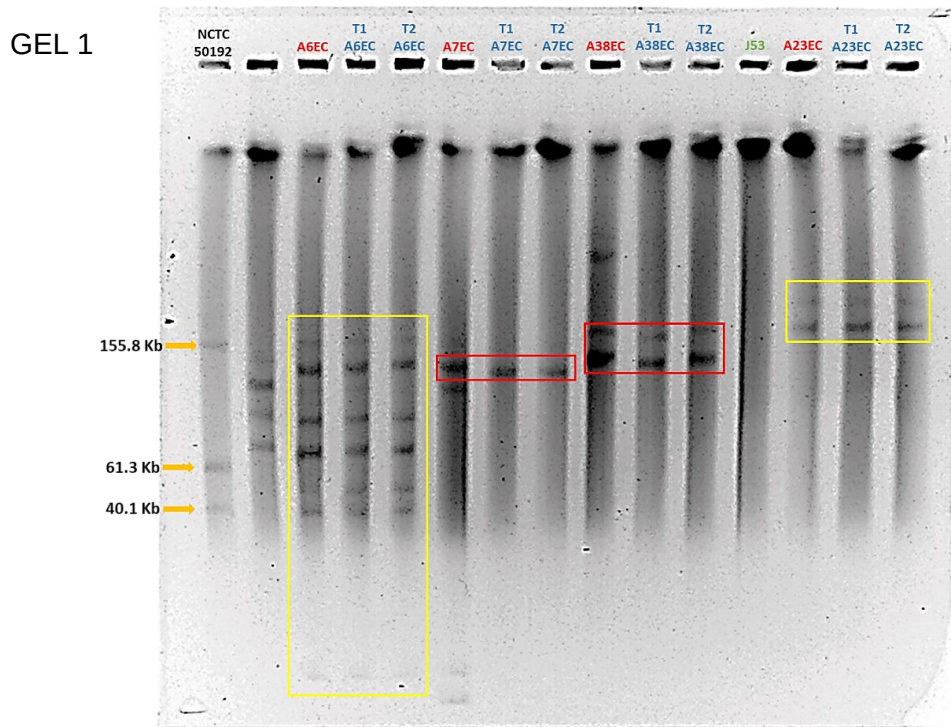


Figura 20. Resultados de los ensayos de conjugación.

En rojo se representan las cepas que no conjugaron y en azul las cepas que sí lograron conjugación, también se indica cuales fueran las cepas que conjugaron y las que no.

A las cepas transconjugantes confirmadas se les determinó el tipo de relaxasa y SAP que lograron transferirse en la conjugación, observándose que las relaxasas posiblemente involucradas en el proceso de conjugación de estas cepas transconjugantes (N=8) fueron las F12 (n=6), P12 (n=2) y P51 (n=3); y los SAP que presentaban estas cepas fueron *relBE* (n=7), *hok-sok* (n=4), *srnBC* (n=4), *pemKI* (n=3), *vagCD* (n=1) y *pndAC* (n=1). En la tabla 21 se muestran las cepas transconjugantes comparadas con las donadoras,

pudiéndose observar cuantos plásmidos se transfirieron, así como su tamaño, las relaxasas que posiblemente estaban implicadas en esta transferencia y los SAP que estaban presentes en los plásmidos transferidos.



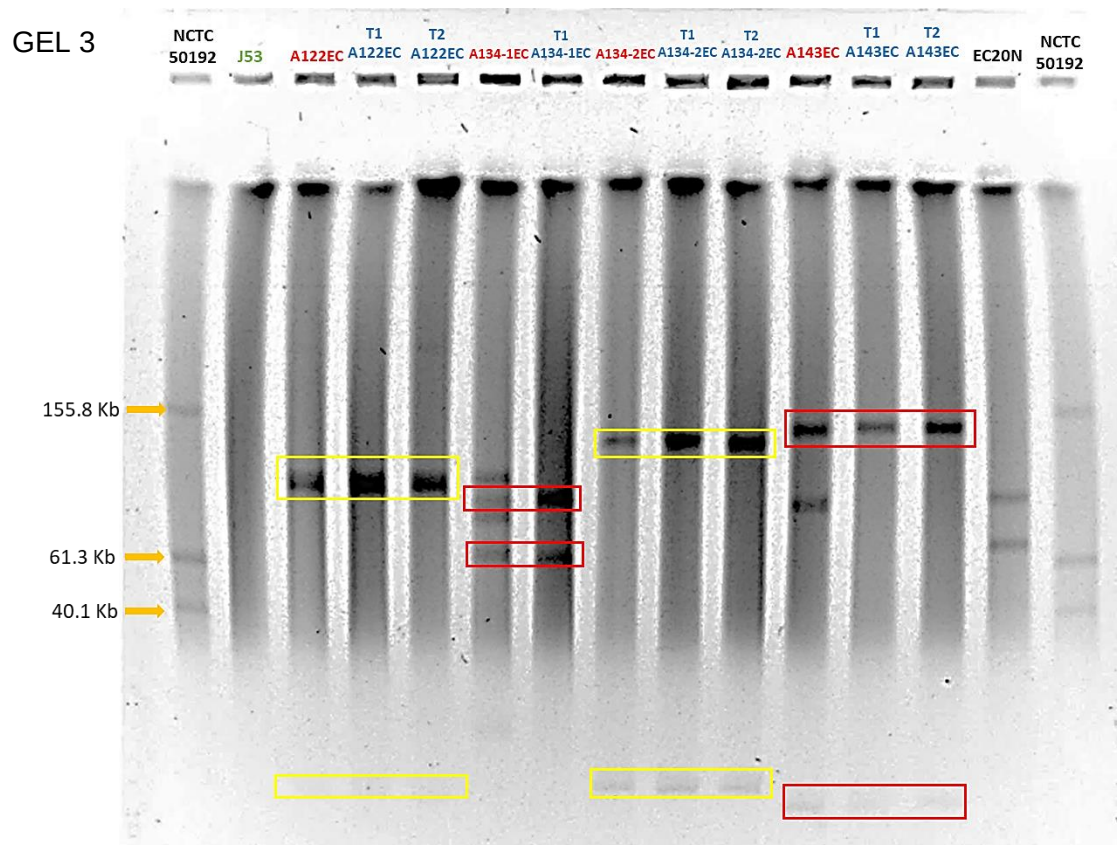


Figura 21. Perfiles plasmídicos de las cepas transconjugantes, de las cepas donadoras y de la cepa receptora como control.

En las imágenes de los corrimientos de PFGE+S1 se comparan los perfiles plasmídicos de las posibles cepas transconjugantes con sus cepas donadoras. Con letras verdes se muestra la cepa receptora, en letras rojas se muestran las cepas donadoras, en letras azules se muestran las 2 posibles cepas transconjugantes denominadas T1 y T2 y en letras negras se muestra la cepa NCTC 50192 usada como control de corrimiento. Los recuadros amarillos indican las cepas que presentaron el mismo perfil plasmídico que la donadora y en los recuadros rojos se indican los plásmidos de las cepas transconjugantes que presentaron un perfil plasmídico diferente al de la donadora. En el gel 1 en el carril 2 que se muestra sin identificar, se corrió una cepa proveniente de otro estudio, de igual manera en el gel 3 en el carril identificado como EC20N se corrió una cepa proveniente de otro estudio, por lo que no se deben de tomar en consideración para este estudio. De la cepa A134-1EC solo se recuperó una cepa transconjugante.

Tabla 21. Características de las cepas donadoras y transconjugantes de *E. coli*.

Cepa	Fenotipo de resistencia	Fenotipo BLEE	# Plásmidos:Tamaño (Kb)	Relaxasa	SAP
A7EC	CXM, CAZ, FEP, ATM, S , GM, NN , NA , CIP , TE , C	+	4 : 120.1, 104.3, <40.1, <40.1	F12,P51	<i>pemKI, relBE, hok-sok, srnBC</i>
Tc1 A7EC	CXM, CAZ, FEP, ATM, GM, C	+	1 : 120.1	F12, P51	<i>pemKI, relBE, hok-sok, srnBC</i>
A38EC	CXM, CAZ, FEP , ATM, S, GM, NN, NA, CIP, TE, C, SXT	+	2 : 235.8, 126.8	F12	<i>pemKI, relBE, hok-sok, srnBC</i>
Tc1 A38EC	CXM, CAZ, ATM, S, GM, NN, NA, CIP, TE, C, SXT	+	2 : 235.8, 126.8	F12	<i>pemKI, relBE, hok-sok, srnBC</i>
A44EC	CXM, CAZ, FEP, ATM, S , NA	+	3 : 103.2, 95.8, 52	-	<i>relBE</i>
Tc1 A44EC	CXM, CAZ, FEP, ATM	+	2 : 95.8, 52	-	<i>relBE</i>
Tc2 A44EC	CXM, CAZ, FEP, ATM	+	1 : 95.8	-	<i>relBE</i>
A65EC	AMC, CXM, CAZ, FOX, ATM , S , TE , TMP , SXT	-	3 : 115.2, 85.8, 65.4	F12, P12	<i>relBE, vagCD, pndAC</i>
Tc1 A65EC	AMC, CXM, CAZ, FOX, S, TMP, SXT	-	2 : 85.8, 65.4	F12, P12	<i>relBE, vagCD, pndAC</i>
Tc2 A65EC	AMC, CXM, CAZ, FOX	-	1 : 65.4	P12	<i>relBE, vagCD, pndAC</i>
A101EC	CXM, CAZ, FEP , ATM, S , GM , AN , NN , NA , CIP , TE	+	2 : 70.8, 64.2	F12	<i>ccdAB, relBE, hok-sok, srnBC</i>
Tc1 A101EC	CXM, CAZ, FEP, ATM	+	1 : 64.2	F12	<i>relBE, hok-sok, srnBC</i>
Tc2 A101EC	CXM, CAZ, ATM	+	1 : 70.8	F12	<i>relBE, hok-sok</i>
A122-2EC	CXM, CAZ, FEP, ATM, AN , S, NA, TE	+	2 : 99.7, <40.1	P51	<i>relBE</i>
Tc2 A122EC	CXM, CAZ, FEP, ATM, S, NA, TE	+	1 : 99.7	P51	-
A134-1EC	AMC, CXM, CAZ, FEP, FOX, ATM, S , GM , NN , NA , CIP , TE , C, SXT	-	5 : 106.8, 94.3, 83, 63, <40.1	F12, P12	<i>pemKI, ccdAB, relBE, vagCD, pndAC, srnBC</i>
Tc1 A134-1EC	AMC, CAZ, FEP, FOX, ATM	-	2 : 94.3, 63	-	<i>relBE</i>
A143EC	CXM, FEP, ATM, S, GM, NN , NA, CIP , TET, C, TMP SXT	+	3 : 144.2, 93.3, <40.1	F12, P51	<i>pemKI, hok-sok, srnBC</i>
Tc1 A143EC	CXM, S, GM, NA, TET, C, TMP, SXT	+	1 : 144.2	F12, P51	<i>pemKI, hok-sok, srnBC</i>

Las cepas con letras rojas representan a las transconjugantes, los antimicrobianos con letras rojas representan las diferencias en el fenotipo de resistencia respecto a las transconjugantes. Todas las cepas en la tabla fueron resistentes a CTX. AN: Amikacina; GM: Gentamicina; S: Estreptomycin; NN: Tobramicina; NA: Ácido Nalidíxico; CIP: Ciprofloxacino; TMP: Trimetoprim; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol; C: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina; AMC: Amoxicilina + Clavulonato; CXM: Cefuroxima; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; FOX: ceftaxitina.

8. DISCUSIÓN

Los cambios actuales en la economía, el clima, la producción de alimentos y los sistemas de suministros a nivel mundial se han visto afectados, teniendo efectos sobre los sistemas de inocuidad alimentaria, la nutrición y la seguridad alimentaria, que se encuentran inextricablemente relacionadas, teniendo repercusiones en los consumidores e incluso en la salud mundial, lo que genera desafíos para la sustentabilidad y el desarrollo de las naciones. Esta situación genera serios problemas en la inocuidad alimentaria a nivel mundial ya que, en la actualidad, debido a la globalización, las cadenas alimentarias atraviesan fácilmente las fronteras entre las naciones (OMS, 2019).

Una gran problemática que se ha visto relacionada con las complicaciones en la inocuidad de los alimentos, es la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos como *E. coli* (Alonso *et al.*, 2017; Ben Said *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Araujo *et al.*, 2017; Irrgang *et al.*, 2017; Amézquita-Montes *et al.*, 2015; Gómez-Aldapa *et al.*, 2016; Barrios-Villa *et al.*, 2018). La resistencia a los antimicrobianos plantea una crisis mundial que pone en riesgo la salud humana, animal e incluso de las plantas, ya que actualmente se han reportado niveles alarmantes de resistencia antibiótica en países de todos los niveles socioeconómicos, amenazando la salud y la seguridad alimentaria de las naciones, lo que plantea un gran desafío para lograr una cobertura sanitaria mundial (IACG, 2019).

Debido a que la problemática de la resistencia antimicrobiana involucra varios factores que incluyen a los humanos, los animales, las plantas, el agua, los alimentos y el medio ambiente, este estudio se enfocó en el aspecto de los alimentos, con el objetivo de evaluar la virulencia y resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos y así poder tener un panorama de cómo se encuentra la situación actual en la comunidad de Puebla, respecto a la distribución de cepas de *E. coli* con características de virulencia y resistencia.

En este estudio se identificaron cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos listos para su consumo provenientes de la ciudad de Puebla y se caracterizó molecularmente la virulencia y resistencia de estas cepas, siendo este uno de los primeros estudios realizados en México de este tipo.

En este estudio el porcentaje de aislamiento de cepas de *E. coli* respecto al número de muestras obtenidas fue bajo debido a que se usó CTX para seleccionar las cepas con potencial de resistencia hacia antibióticos β -lactámicos; debido a esto, se originó un sesgo de los resultados con respecto a la obtención de cepas de *E. coli* que pudo ser mucho más alta si no se hubiera utilizado el antibiótico para el tamizaje de las cepas. Probablemente se perdieron cepas de *E. coli* patógenas que no presentaban genes de resistencia o bien que poseían genes de resistencia a antibióticos diferentes a los β -lactámicos (incluyendo los de las β -lactamasas). Sin embargo, estos resultados concuerdan con el porcentaje de cepas DEC aisladas de vegetales, reportados previamente en México (Gómez-Aldapa *et al.*, 2016_a; Gómez-Aldapa *et al.*, 2016_b).

Además, se encontró una baja proporción de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (7%) o AmpC plasmídicas (1.4%) aisladas de vegetales crudos que estaban listos para su consumo. A nivel mundial la prevalencia de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE aisladas de vegetales ha sido relativamente baja siendo menor del 10%. En el presente estudio se presentó una prevalencia de cepas de *E. coli* BLEE positivas del 7% que concuerda con estudios anteriores de otros países (Kim *et al.*, 2015; Ben Said *et al.*, 2015; Randall *et al.*, 2017). Todas las cepas de este estudio presentaron multidrogorresistencia, observándose una alta resistencia hacia los aminoglucósidos, quinolonas, cloranfenicol y sobre todo a tetraciclinas. La resistencia a tetraciclina encontrada en estas cepas, es importante ya que es un antimicrobiano que no es usado para el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli*, pero es ampliamente usado en veterinaria y como promotor de crecimiento animal (Jara, 2007); esto nos podría indicar que puede estar influyendo en la selección y diseminación de cepas resistentes a las tetraciclinas, al estar contaminando los campos de cultivo de los vegetales a través del agua y heces de animales. Esto junto con la ineficiente inocuidad en el manejo de los alimentos estas cepas de *E. coli* TET^R se encuentran en los vegetales crudos listos para su consumo.

El gen de la BLEE más frecuente en estas cepas fue *bla*_{CTX-M}, que es actualmente el más abundante en cepas de *E. coli* y el más distribuida a nivel mundial. (Cantón *et al.*, 2012; Bevan *et al.*, 2017). En este estudio se encontraron las variantes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-55}, este última fue el más prevalente. La variante CTX-M-55 muestra una alta prevalencia en países de Asia como China, Tailandia y Vietnam y de Europa como Francia y Suiza en

cepas de *E. coli* de origen humano, de alimentos, de animales y del ambiente, aunque se ve una mayor prevalencia en las cepas aisladas de muestras de zonas rurales provenientes de animales, de alimentos y del ambiente (Yves *et al.*, 2018; Bevan *et al.*, 2017; Runcharoen *et al.*, 2017; Hoang, *et al.*, 2016; Zurfluh *et al.*, 2015). Existen reportes en donde se demuestra que las variantes CTX-M-14 y -15 han desplazado a otras variantes, siendo las de mayor prevalencia a nivel mundial (Bevan *et al.*, 2017; Zurfluh *et al.*, 2015). Nosotros observamos que la variante CTX-M-55 es la más prevalente en vegetales crudos, seguida de la CTX-M-15 que es la más prevalente en México y Norte América, tanto en cepas clínicas como en cepas de origen animal (Bevan *et al.*, 2017). Otras BLEE identificadas fueron la TEM y OXA en menor proporción (n=5 y n=1, respectivamente) y que no son tan prevalentes (Ojer-Usoz *et al.*, 2017; Yamasaki *et al.*, 2018), pero se demuestra que siguen estando presentes en las cepas de *E. coli*, aportando a la resistencia antibiótica, aunque han sido desplazadas por CTX-M. Cabe destacar que en la cepa A65EC, que no presentó un fenotipo BLEE, se encontró una TEM que de acuerdo a su fenotipo de resistencia pudo tratarse de una variante resistente al inhibidor de β -lactamasas.

Las β -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas son enzimas que también se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial, la más prevalente la CMY y que son de gran preocupación por que confieren un fenotipo de resistencia similar al de las BLEE. Las CMY también tienen la capacidad de degradar cefamicinas y no son inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam, que son antibióticos usados como alternativa de tratamiento en infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE (Jacoby, 2009). En este estudio se aislaron 2 cepas portadoras de *bla*_{CMY} que presentaron un fenotipo de resistencia amplio hacia los β -lactámicos y que pueden crecer aún en presencia de inhibidores de β -lactamasas, observando el potencial de acción que tienen estas enzimas con los β -lactámicos. La prevalencia de CMY es menor en estas cepas, pero podemos encontrarlas en este tipo de muestras indicando que este gen se encuentra distribuido en la comunidad y podría aumentar su prevalencia debido al uso indiscriminado de β -lactámicos con inhibidores, ocasionando serios problemas para el manejo de las infecciones bacterianas humanas.

La presencia de genes de resistencia hacia los demás grupos de antibióticos, mostró una prevalencia baja. De los genes involucrados en la resistencia a quinolonas se encontró en mayor proporción *qnrB* (del cual no se identificó su variante) y el gen *aac(6')-Ib*. Sin embargo, las cepas presentan una alta resistencia hacia las quinolonas lo cual sugiere que la resistencia podría estar conferida por mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* principalmente, lo que en caso de ser confirmado nos indicaría que la resistencia a este grupo de antimicrobianos se disemina principalmente de manera vertical entre las cepas de *E. coli*. (Aldred *et al.*, 2014; Naeem *et al.*, 2015)

Los genes involucrados en la resistencia a aminoglucósidos fueron principalmente *aac(3')-II* (que confiere resistencia hacia gentamicina y tobramicina principalmente) y *aadA* (que confiere resistencia a estreptomicina) que concuerda con el fenotipo de resistencia de las cepas y que se encuentran con una prevalencia del 58% en las cepas de *E. coli* concordando con estudios previos (Xiao & Hu, 2012). Con estos datos, no podemos asegurar que estos genes de resistencia a aminoglucósidos son los más prevalentes ya que no se buscaron otros genes involucrados.

Otro gen que se encontró en gran prevalencia fue *tetA* que confiere resistencia a tetraciclinas y que concuerda con el fenotipo de resistencia presentado por las cepas, observando que este gen se encuentra ampliamente distribuido en cepas de *E. coli*; reportándose con una alta resistencia a este antibiótico en cepas Gram negativas aisladas de animales (90 al 100%), donde principalmente portan los genes *tetA*, *tetB* y *tetO* (Jara, 2007), en comparación con las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos podemos observar que se presenta un porcentaje de resistencia (91.7%) similar a lo reportado en veterinaria y que estas cepas portan principalmente el gen *tetA* y ninguna es portadora de *tetB* (Jara, 2007; Alekshun & Levy, 2007).

La resistencia a cloranfenicol no se pudo demostrar molecularmente ya que, aunque las cepas presentan un alto porcentaje de resistencia hacia este antimicrobiano, solo una cepa presenta el gen *catA*, y ninguna cepa el gen *cmlA*, sugiriendo que esta resistencia podría deberse a otros genes de resistencia involucrados, que no se buscaron como *catB* reportado por Barrios-Villa y cols. en cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos (Barrios-Villa *et al.*, 2018).

Por otro lado, respecto a la virulencia de las cepas de *E. coli* podemos observar que las cepas no presentaron genes que son usados para identificar a los patotipos DEC y usando un esquema asignado a la caracterización de cepas UPEC O25:H4 ST131, las cepas presentan en su mayoría un virotipo A o no poseen ninguno de los genes de virulencia de este esquema. Adicionalmente se encontró una alta presencia de PAI-*II*_{CFT073} siendo esta PAI la más distribuida en cepas de *E. coli*, tanto en cepas patógenas como comensales (Sabaté *et al.*, 2006). Además, se determinó que la cepa A23EC (porta *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{OXA}, *aac*(6')-Ib y *aac*(3')-II) es una cepa UPEC ya que pertenece al serotipo O25:H4, presenta las dos PAI de CFT073 y 2 de 536, pertenece al filogrupa B2 y presenta el virotipo con más genes de virulencia en comparación con las otras cepas. Este es un nuevo hallazgo, ya que este virotipo no había sido reportado anteriormente por el esquema utilizado para la virotipificación de las cepas (Barrios-Villa *et al.*, 2018). Para el resto de las cepas no fue clara su clasificación respecto a su virulencia, pues es difícil clasificarlas como comensales o ExPEC ya que se ha reportado que cepas comensales también poseen PAIs y pueden presentar factores de virulencia que determinamos en este estudio (Sabaté *et al.*, 2006); por lo que sería necesario usar otros esquemas de clasificación propuesto para la determinación de ExPEC y UPEC (Johnson *et al.*, 2003; Spurbeck *et al.*, 2012).

Los plásmidos juegan un papel muy importante en la variabilidad genética y evolución de las bacterias al conferirles características especiales para adaptarse mejor a un nicho ecológico, como la resistencia a los antimicrobianos que le confieren la capacidad de sobrevivir en un medio donde esté presente un antibiótico. Los plásmidos de resistencia representan un gran desafío en la problemática de la resistencia mundial a los antimicrobianos ya que tienen la capacidad de diseminar determinantes de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes (Carattoli, 2013). En este estudio se encontró una gran variabilidad plasmídica en las cepas de *E. coli*, lo cual se atribuye a que las cepas se encontraban en nichos con una gran diversidad bacteriana y que potencialmente recibieron los plásmidos mediante transferencia horizontal genética. Podemos observar que en estas cepas se encontró con gran prevalencia plásmidos con grupos de incompatibilidad IncF, que son plásmidos de bajo número de copias, se

caracterizan por ser plásmidos conjugativos y son plásmidos que se encuentran distribuidos en las enterobacterias; típicamente estos plásmidos suelen presentar múltiples replicones conteniendo comúnmente FII, FIA y FIB (Rozwandowicz *et al.*, 2018); como lo probablemente encontrado en la cepa A23EC en donde se identificó solo un plásmido mediante PFGE-S1 y que por PBRT se determinó que esta cepa posee estos 3 grupos de incompatibilidad, por lo que muy probablemente este plásmido sea un multireplicón. Además, estos plásmidos suelen distribuir genes BLEE de manera frecuente, como *bla*_{CTX-M}, genes de carbapenemasas, de resistencia a aminoglucósidos y de resistencia a quinolonas. Comúnmente el gen *bla*_{CTX-M-15} se asocia con plásmidos IncFII, siendo este grupo de incompatibilidad el más prevalente en las cepas de este estudio y aunque no se determinó la localización de los genes *bla*_{CTX-M} podríamos sugerir que se encuentran en este tipo de plásmidos. Otros grupos de incompatibilidad que también se presentaron en alta frecuencia fueron los pertenecientes a los plásmidos colicinogénicos o IncColE que son plásmidos que codifican colicina E1 y también portan diferentes genes de resistencia aunque comúnmente se asocian con la diseminación de genes *qnrB*, además se ha observado que frecuentemente portan genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, *sul2*, *tetA* y *strA/B* (Rozwandowicz *et al.*, 2018), lo que concuerda con los genes encontrados en este estudio, pero como no se determinó la localización de estos no podemos asegurar que se encuentren en este tipo de plásmidos. De igual manera la relaxasa con mayor presencia en las cepas fueron de la familia MOB-F y MOB-P que corresponden a plásmidos IncF e IncColE respectivamente, las cuales se encuentran en plásmidos conjugativos que presentan genes de resistencia (Alvarado *et al.*, 2012).

Otro resultado interesante fue la gran cantidad de SAP presentes en las cepas del estudio, presentándose en mayor proporción el sistema *relBE* que concuerda con los resultados de Barrios que los reporta en las cepas de *E. coli* provenientes de alimentos (Barrios, 2019). Esta gran cantidad de SAP les confiere a los plásmidos, el poder de asegurar su permanencia en las cepas de *E. coli* contribuyendo con su prevalencia y la diseminación de los genes de resistencia y virulencia que se encuentran en estos plásmidos (Mnif *et al.*, 2010).

La diseminación de los plásmidos, así como de los determinantes de resistencia y virulencia presentes en ellos, se lleva a cabo mediante el proceso de conjugación para transferirse horizontalmente a otras cepas (Carattoli, 2013). Los resultados de conjugación nos muestran que estas cepas de *E. coli* (8/12) tienen la capacidad de diseminar determinantes de resistencia, los plásmidos involucrados portan relaxasas MOB-F y MOB-P lo que coincide con la prevalencia de estos plásmidos portadores de genes de resistencia y su papel en la diseminación de estos determinantes (Carattoli, 2013; Rozwandowicz *et al.*, 2018).

De manera general podemos observar en este muestreo de vegetales crudos que estaban listos para su consumo, la diseminación de cepas de *E. coli* portadoras de genes de resistencia y virulencia en la ciudad de Puebla, al aislar cepas de *E. coli* MDR portadoras de BLEE, con bajo número de genes de virulencia y con un gran número de genes de resistencia a antimicrobianos; encontrándose solo una cepa caracterizada molecularmente como UPEC. Sin embargo, no se descarta que pudieran tratarse de cepas ExPEC. Llama la atención que la cepa A23EC denominada como UPEC presenta un plásmido y se identificaron los replicones Inc FII, FIA, FIB y A/C; por lo que inferimos que esta cepa presenta un plásmido multireplicón del grupo IncF, que se recomienda identificar mediante pMLST para poder conocer el subtipo de plásmido ya que los plásmidos multireplicón que portan genes de resistencia, como el F31:A4:B1 que se encuentra ampliamente distribuido en cepas de *E. coli* a nivel mundial, portan frecuentemente *bla*_{CTX-M-15} (Irrgang *et al.*, 2017; Madec y Haenni, 2018).

Estos resultados muestran una prevalencia alta de *bla*_{CTX-M-55} en aislados de *E. coli* provenientes de vegetales crudos y que además, podemos inferir se encuentra en plásmidos MOB-F y que probablemente portan otros genes de resistencia; en México se ha reportado la presencia de esta variante en un aislado clínico de *E. coli* proveniente de un paciente pediátrico, el cual portaba también el gen *mcr-1* que codifica para una fosfoetanolamina transferasa que modifica el sitio blanco del antibiótico (Merida-Vieyra *et al.*, 2019). Además, se ha reportado *bla*_{CTX-M-55} en otros países, como en Francia donde se observa asociada y/o se co-localiza frecuentemente con los genes *mcr-1*, *fosA* y *rmtB* en plásmidos epidémicos IncF e IncI1, en cepas tanto clínicas como de origen animal de *E. coli* (Birgy *et al.*, 2018; Lupo *et al.*, 2018). En Asia el gen *bla*_{CTX-M-55} es el segundo gen

de BLEE más común presente en cepas de *E. coli* de origen humano y animal, y se localiza mayormente en plásmidos IncF, IncI1 e IncHI2 y frecuentemente se asocia con los genes *fosA*, *rmtB* y genes de resistencia a quinolonas (Zhang *et al.*, 2014; Runcharoen *et al.*, 2017; Hoang, *et al.*, 2016; Zurfluh *et al.*, 2015; Lupo *et al.*, 2018). La CTX-M-55 es una variante que deriva de la CTX-M-15 que difieren únicamente por la sustitución A80V y presenta actividad hidrolítica para ceftazidima y cefotaxima gracias a la mutación D240G en el sitio activo que además confiere resistencia a los demás β -lactámicos con excepción de las cefamicinas y los carbapenémicos. En este estudio podemos observar que el gen *bla*_{CTX-M-55} se encuentra en mayor proporción (6/10) en cepas de *E. coli* portadoras de BLEE que se encuentran distribuidas en los alimentos de origen vegetal, por lo que se presenta un alto riesgo de transmisión a los humanos por el consumo de estos alimentos; siendo este el primer reporte del gen *bla*_{CTX-M-55} en cepas de *E. coli* aisladas de vegetales, realizado en México.

La presencia de estas cepas portadoras de genes de resistencia, que tienen la capacidad de diseminar estos genes por conjugación, generan un problema de salud en la comunidad poblana ya que estas cepas provenientes de alimentos pueden diseminarse en la población que consume este tipo de vegetales, lo cual es muy común, y aunque teniendo una baja virulencia tienen la capacidad de transferir genes de resistencia. Todo esto puede estar generando enfermedades de transmisión alimentaria infecciosas de difícil tratamiento y contribuyendo en la diseminación de los genes de resistencia en gran parte de la población.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Los vegetales crudos listos para su consumo que se venden en los establecimientos de comida en la ciudad de Puebla podrían ser potenciales reservorios de cepas de *E. coli* multidrogorresistentes, productoras de BLEE y AmpC plasmídicas.
- 9.2 El consumo de vegetales crudos puede formar parte de una vía de transmisión de cepas de *E. coli* multidrogorresistentes hacia los humanos.
- 9.3 Las cepas de *E. coli* multidrogorresistentes productoras de BLEE y AmpC plasmídicas se aislaron principalmente de muestras de cilantro.
- 9.4 La BLEE CTX-M-55 fue la cefotaximasa más abundante en las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos.
- 9.5 El gen de la cefamicinasa CMY se encontró en 2 cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos, lo que demuestra su presencia en este tipo de alimentos.
- 9.6 El gen plasmídico, más frecuente, involucrado en la resistencia a quinolonas en cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos fue *qnrB*.
- 9.7 Los genes asociados con la resistencia a aminoglucósidos más abundantes en cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos fueron *aac(3')-II* y *aadA*.
- 9.8 Los genes involucrados con la resistencia a trimetoprim y sulfonamidas presentes en las cepas de *E. coli* fueron principalmente *dfrA1/5/14*, seguido de *dfrA7/17* y *dfrA12*; y *sul1* y *sul3* respectivamente.
- 9.9 Las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos presentaron una alta resistencia a tetraciclina mediada por el gen *tetA*, de igual manera se presentó una alta resistencia a cloranfenicol del cual no se pudo identificar concretamente el mecanismo molecular de resistencia.
- 9.10 No se identificó ningún patotipo diarreogénico en las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos; pero se aisló una cepa de UPEC O25:H4-B2 proveniente de muestras de espinacas crudas
- 9.11 El virotipo más común en las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos fue el virotipo A; además, se identificó un nuevo virotipo al que se denominó virotipo H
- 9.12 Los grupos de incompatibilidad más comunes en las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos fueron IncF seguido de IncColE.

- 9.13** Las relaxasas más comunes en los plásmidos que portan las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos fueron las de la familia MOB-F seguida de MOB-P.
- 9.14** Los sistemas de adicción de los plásmidos, más comunes, que portaban las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos fueron *relBE*, *srnBC* y *pemKI*.
- 9.15** El 67% de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos presentó la capacidad de conjugación, transfiriendo plásmidos MOB-F y MOB-P portadores de genes de resistencia a β -lactámicos.

10. PERSPECTIVAS

- 10.1** El incremento de la resistencia a colistina y fosfomicina en cepas de *E. coli* se ha reportado actualmente, por lo que se recomienda determinar la resistencia a estos antimicrobianos en estas cepas de *E. coli*.
- 10.2** Determinar el serotipo mediante metodologías moleculares de las cepas de *E. coli* que no pudieron serotipificarse mediante el método de aglutinación en placa.
- 10.3** Estudiar la localización de CTX-M y CMY de las cepas de *E. coli* mediante *Southern blot*.
- 10.4** Evaluar la presencia de integrones en las cepas de *E. coli*, así como su estructura genética.
- 10.5** Determinar la presencia de secuencias de inserción que se han visto relacionadas con los genes de resistencia como IS26 e ISEcp1.
- 10.6** Determinar la ST de las cepas de *E. coli* aisladas de vegetales crudos
- 10.7** Secuenciar algunas cepas de interés de *E. coli* aisladas de vegetales crudos y realizar estudios de genómica comparativa, para poder obtener todas las variantes de los genes de resistencia, así como los diferentes genes de virulencia que no se buscaron.
- 10.8** Repetir los ensayos de conjugación en las cepas de *E. coli* que no pudieron conjugarse y cambiar las condiciones de la metodología para poder obtener cepas transconjugantes, así como implementar ensayos de transformación en estas mismas cepas para poder evaluar de una mejor manera la capacidad de transferencia de los genes de resistencia.
- 10.9** Buscar genes de virulencia en las cepas transconjugantes para evaluar la transferencia de determinantes de virulencia entre las cepas de *E. coli*.
- 10.10** En futuros estudios se recomienda no sesgar la selección de cepas de *E. coli* con medios adicionados con antimicrobianos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Oshero, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53, 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050. doi:10.1016/j.cell.2007.03.004
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(4), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Alonso, C. A., Zarazaga, M., Ben-Sallem, R., Jouini, A., Ben-Slama, K., & Torres, C. (2017). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals. The African perspective. *Lett Appl Microbiol.*, 64(5), 318-334. doi:10.1111/lam.12724
- Alonso, J. C., Ayora, S., Canosa, I., & Weise, F. (1996). Site-specific recombination in Gram-positive theta-replicating plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 142, 1-10.
- 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). doi:10.1371/journal.pone.0040438
- Álvarez-Hernández, D. A., Garza-Mayén, G. S., & Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista chilena de Infectología*, 32(5), 499-504. doi:10.4067/S0716-10182015000600002
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 289, 321-331.
- Amézquita-Montes, Z., Tamborski, M., Kopsombut, U. G., Zhang, C., Arzuza, O. S., & Gómez-Duarte, O. G. (2015). Genetic Relatedness Among *Escherichia coli* Pathotypes Isolated from Food Products for Human Consumption in Cartagena, Colombia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(5), 454-461. doi:10.1089/fpd.2014.1881
- Araújo, S., A.T. Silva, I., Tação, M., Patinha, C., Alves, A., & Henriques, I. (2017). Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 192-200. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.020
- Bajaj, P., Singh, N. S., & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli* β -lactamases: What really matters. In (Vol. 7, pp. 1-14): Frontiers Media S.A.
- Barrios-Villa, E. (2019). *Estudio de la transferencia genética de la resistencia a antimicrobianos en Escherichia coli aisladas de diferentes orígenes y genómica comparativa de cepas ST131*.
- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano Zarain, P., Romero-Romero, S., Lara Flores, N., Estepa, V., Somalo, S., Torres, C., Rocha-Gracia, R. d. C. (2018). Characterization of extended-spectrum and CMY-2 β -lactamases, and associated virulence genes in *Escherichia coli* from food of animal origin in México. *British Food Journal*, 120(7), 1457-1473. doi:10.1108/BFJ-02-2018-0104
- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zaraín, P., Arenas-Hernández, M. M. P., Martínez de la Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., Torres, C., Rocha-Gracia, R. D. C. (2018). Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: new *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 17(1), 42. doi:10.1186/s12941-018-0295-4
- Barton, B. M., Harding, G. P., & Zuccarelli, A. J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical Biochemistry*, 226, 235-240.
- Bassa, A., Dadie, A., Guessennd, N., Gbonon, V., Dako, E., Dje, M., & Dosso, M. (2010). Virulence factors and resistance profile of *Shigella* isolated during infectious diarrhea in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(6).
- Batchelor, M., Clifton-Hadley, F. A., Stallwood, A. D., Paiba, G. A., Davies, R. H., & Liebana, E. (2005). Detection of Multiple Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* from a Cattle Fecal

- Sample in Great Britain. *Microbial Drug Resistance*, 11(1), 58-61. doi:10.1089/mdr.2005.11.58
- Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Caniça, M. M., Vedel, G., Névot, 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. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb07010.x
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., Ben Slama, K., 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. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023
- Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2145-2155. doi:10.1093/jac/dkx146
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H. (2011). Characterization of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of hemolytic uremic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(9), 671-676. doi:10.1016/S1473-3099(11)70165-7
- Birgy, A., Madhi, F., Hogan, J., Doit, C., Gaschignard, J., Caseris, M., & Bidet, P. (2018). CTX-M-55-, MCR-1-, and FosA-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Infection in a Child in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4), 1-2.
- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G., Herrera, A., Marzoa, J., Fernández, Val De La Cruz, F., Martínez-Martínez, L., Alonso, M. P., Nicolas-Chanoine, M. H., Johnson, J. R., Johnston, B., López-Cerero, L., Pascual, A., Rodríguez-Baño, J. (2013). Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3358-3367. doi:10.1128/JCM.01555-13
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. In (Vol. 48, pp. 1-14).
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. In (Vol. 14, pp. 933-951).
- Brenner, D. J., & Farmer, J. J. (2015). Enterobacteriaceae. *Bergey's Manual Trust*, 888-894. doi:10.1002/9781118960608.fbm00222
- Briñas, L., Lantero, M., de Diego, I., Alvarez, M., Zarazaga, M., & Torres, C. (2005). Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1107-1110. doi:10.1093/jac/dki370
- Briñas, L., Moreno, M. A., Zarazaga, M., Porrero, C., Sáenz, Y., García, M., Dominguez, L., Torres, C. (2003). Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6), 2056-2058. doi:10.1128/AAC.47.6.2056-2058.2003
- Brolund, A., Sundqvist, M., Kahlmeter, G., & Grape, M. (2010). Molecular characterization of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. *PLoS ONE*, 5(2). doi:10.1371/journal.pone.0009233
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. In (Vol. 54, pp. 969-976).
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. In (Vol. 39, pp. 1211-1233): American Society for Microbiology.

- Callejón, R. M., Rodríguez-Naranjo, M. I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2015). Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(1), 32-38. doi:10.1089/fpd.2014.1821
- Campos, J., Gil, J., Mourão, J., Peixe, L., & Antunes, P. (2015). Ready-to-eat street-vended food as a potential vehicle of bacterial pathogens and antimicrobial resistance: An exploratory study in Porto region, Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 1-6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.016
- Canica, M. M. M., Lu, C. Y., Krishnamoorthy, R., & Paul, G. C. (1997). Molecular diversity and evolution of bla(TEM) genes encoding β -lactamases resistant to clavulanic acid in clinical *E. coli*. *Journal of Molecular Evolution*, 44(1), 57-65. doi:10.1007/PL00006121
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: Origin and diffusion. In (Vol. 3): Frontiers Research Foundation.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. In (Vol. 53, pp. 2227-2238).
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. In (Vol. 301, pp. 654-658).
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. In (Vol. 303, pp. 298-304).
- 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. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
- Carattoli, A., Seiffert, S. N., Schwendener, S., Perreten, V., & Endimiani, A. (2015). Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS ONE*, 10(5). doi:10.1371/journal.pone.0123063
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., & Estrada-García, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156(2), 176-180. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.025
- Cattoir, V., Poirel, L., & Nordmann, P. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3801-3804. doi:10.1128/AAC.00638-08
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 394-397. doi:10.1093/jac/dkm204
- Cerna-Cortés, J. F., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Torres-Vitela, M. d. R., Villarruel-López, A., & Castro-Rosas, J. (2012). Presence of some indicator bacteria and diarrheagenic *E. coli* pathotypes on jalapeño and serrano peppers from popular markets in Pachuca City, Mexico. *Food microbiology*, 32(2), 444-447. doi:10.1016/j.fm.2012.07.012
- Cherry, C., Mohr, A. H., Lindsay, T., Diez-Gonzalez, F., Hueston, W., & Sampedro, F. (2014). Knowledge and Perceived Implementation of Food Safety Risk Analysis Framework in Latin America and the Caribbean Region. *Journal of Food Protection*, 77(12), 2098-2105. doi:10.4315/0362-028x.jfp-14-234
- Chávez-Jacobo, V. M., Ramírez-Díaz, M. I., Jesús, S.-S., & Cervantes, C. (2015). Resistencia bacteriana a quinolonas: Determinantes codificados en plásmidos. *REB*, 34(1), 4-9.
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. In (Vol. 3, pp. 71-87).

- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58-65. doi:10.1111/1758-2229.12019
- Clermont, O., Gordon, D., & Denamur, E. (2015). Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(5), 980-988. doi:10.1099/mic.0.000063
- CLSI. (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. M02-A12*: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2018). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (28th ed. Vol. 8): Clinical and Laboratory standards Institute.
- Cortés-Cortés, G. (2016). *Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de Escherichia coli aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México*, Tesis de doctorado.
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. In (Vol. 8, pp. 26-38).
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. In (Vol. 26, pp. 822-880).
- De Gelder, L., Williams, J. J., Ponciano, J. M., Sota, M., & Top, E. M. (2008). Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. *Genetics*, 178(4), 2179--2190. doi:10.1534/genetics.107.084475
- Dobrindt, U. (2005). (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 295(6-7), 357-371. doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.009
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G., & Hacker, J. (2002). Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I536 to PAI IV536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity*, 70(11), 6365-6372. doi:10.1128/IAI.70.11.6365-6372.2002
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes A handbook on the biology of bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass* (Tercera ed. Vol. 6). New York: Springer Science & Business Media.
- Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact*, 16(15). doi:10.1186/s12934-017-0631-y
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438-450. doi:10.4067/S0716-10182016000400009
- Fernandez-Lopez, R., Redondo, S., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2017). Towards a taxonomy of conjugative plasmids. In (Vol. 38, pp. 106-113): Elsevier Ltd.
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., & De La Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(1), 79-100. doi:10.1016/j.femsre.2003.09.001
- Fratamico, P. M., & DebRoy, C. (2010). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food Using Real-Time Multiplex PCR Assays Targeting the stx 1, stx 2, wzy O157, and the fliC h7 or eae Genes. *Food Analytical Methods*, 3(4), 330-337. doi:10.1007/s12161-010-9140-x
- Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. In (Vol. 7): Frontiers Media S.A.
- Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M., & Ming Yi, D. (1995). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2188-2191.
- Frost, L. S., & Koraimann, G. (2010). Regulation of bacterial conjugation: Balancing opportunity with adversity. *Future Microbiology*, 5(7), 1057-1071. doi:10.2217/fmb.10.70

- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732. doi:10.1038/nrmicro1235
- Furuya, E. Y., & Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. In (Vol. 4, pp. 36-45).
- Galli, L., Brusa, V., & Leotta, G. A. (2016). *Escherichia coli* in Food Products. In A. G. Torres (Ed.), *Escherichia coli in the Americas* (1st ed., pp. 173-203): Springer.
- Gannon, V. P. J., Rashed, M., King, R. K., & Thomas, E. J. G. (1993). Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1268-1274.
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., & De La Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 657-687. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x
- García-Fernández, A., Chietto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., & Carattoli, A. (2008). Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1229-1233. doi:10.1093/jac/dkn131
- García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., & Carattoli, A. (2009). Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 274-281. doi:10.1093/jac/dkn470
- García-Fernández, A., Villa, L., Moodley, A., Hasman, H., Miriagou, V., Guardabassi, L., & Carattoli, A. (2011). Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 1987-1991. doi:10.1093/jac/dkr225
- Gerdes, K., Christensen, S. K., & Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. In (Vol. 3, pp. 371-382).
- Gerdes, K., Møller-Jensen, J., & Jensen, R. B. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: Surprises from phylogeny. *Molecular Microbiology*, 37(3), 455-466. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01975.x
- Gerdes, K., & Wagner, E. G. H. (2007). RNA antitoxins. In (Vol. 10, pp. 117-124).
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C.S., Martínez, M. B. (2016). Diarrheogenic *Escherichia coli*. In (Vol. 47, pp. 3-30): Elsevier Editora Ltda.
- Goussard, S., & Courvalin, P. (1999). Updated sequence information for TEM β -lactamase genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2), 367-370.
- Griffin, P. M., Manges, A. R., & Johnson, J. R. (2012). Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clinical Infectious Diseases*, 55(5), 712-719. doi:10.1093/cid/cis502
- Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G., & Riley, L. W. (1995). Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of clinical microbiology*, 33(5), 1375-1377.
- Gómez-Aldapa, C. A., Cerna-Cortes, J. F., Rangel-Vargas, E., Torres-Vitela, M. R., Villarruel-López, A., Gutiérrez-Alcántara, E. J., & Castro-Rosas, J. (2016a). Presence of Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, Enteropathogenic *E. coli* and Enterotoxigenic *E. coli*, on Raw Nopalitos (*Opuntia ficus-indica* L.) and in Nopalitos Salads from Local Retail Markets in Mexico. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(5), 269-274. doi:10.1089/fpd.2015.2065
- Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Bautista-De León, H., & Castro-Rosas, J. (2014). Presence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* and *Salmonella* in fresh beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice from

- public markets in Mexico. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(13), 2705-2711. doi:10.1002/jsfa.6614
- Gómez-Aldapa, C. A., Segovia-Cruz, J. A., Cerna-Cortes, J. F., Rangel-Vargas, E., Salas-Rangel, L. P., Gutiérrez-Alcántara, E. J., & Castro-Rosas, J. (2016b). Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. *Food Microbiology*, 59(August), 97-103. doi:10.1016/j.fm.2016.05.014
- Gómez-Duarte, O. G., Arzuza, O., Urbina, D., Bai, J., Guerra, J., Montes, O., Castro, G. Y. (2009). Detection of *Escherichia coli* Enteropathogens by Multiplex Polymerase Chain Reaction from Children's Diarrheal Stools in Two Caribbean-Colombian Cities. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(2), 199-206. doi:10.1089/fpd.2009.0355
- Hall, A. M. J., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity. In (Vol. 36, pp. 102-110): Elsevier Ltd.
- Hayes, F. (2003). Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science*, 301, 1496-1499. doi:10.2307/3835068
- Herrera-Leon, S., Llorente, M. T., & Sanchez, S. (2016). Plasmid-mediated quinolone resistance in different diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes responsible for complicated, noncomplicated, and traveler's diarrhea cases. In (Vol. 60, pp. 1950-1951): American Society for Microbiology.
- Hoang, T. A. V., Nguyen, T. N. H., Ueda, S., Le, Q. P., Tran, T. T. N., Nguyen, T. N. D., Yamamoto, Y. (2016). Correction to: Common findings of blaCTX-M-55-encoding 104–139 kbp plasmids harbored by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in pork meat, wholesale market workers, and patients with urinary tract infection in Vietnam. *Current Microbiology*, 1-1. doi:10.1007/s00284-017-1395-7
- Huijbers, P. M. C., Graat, E. A. M., van Hoek, A. H. A. M., Veenman, C., de Jong, M. C. M., & van Duinkerken, E. (2016). Transmission dynamics of extended-spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a broiler flock without antibiotic use. *Preventive Veterinary Medicine*, 131, 12-19. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.07.001
- Hülter, N., İlhan, J., Wein, T., Kadibalban, A. S., Hammerschmidt, K., & Dagan, T. (2017). An evolutionary perspective on plasmid lifestyle modes. In (Vol. 38, pp. 74-80).
- IACG. (2019). *No Podemos Esperar: Asegurar El Futuro Contra Las Infecciones Farmacorresistentes Informe para el secretario general de las Naciones Unidas*. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance Retrieved from https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_ES.pdf
- Irrgang, A., Falgenhauer, L., Fischer, J., Ghosh, H., Guiral, E., Guerra, B., Schmoger, S., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Hammerl, J. A., Käsbohrer, A. (2017). CTX-M-15-producing *E. coli* isolates from food products in Germany are mainly associated with an IncF-type plasmid and belong to two predominant clonal *E. coli* lineages. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV). doi:10.3389/fmicb.2017.02318
- Jacoby, G. A. (2006). β -lactamase nomenclature. In (Vol. 50, pp. 1123-1129).
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC B-Lactamases. In (Vol. 22, pp. 161-182).
- Jara, M. A. (2007). Tetraciclinas: Un modelo de resistencia antimicrobiana. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 22(1:2), 49-55.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (Seventh ed.). New York, USA: Springer Science & Business Media.
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol*, 53(8), 2410-2426. doi:10.1128/jcm.00008-15
- 10.1128/JCM.00008-15. Epub 2015 May 13.

- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., & Stell, A. L. (2001). Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(1), 78-88. doi:10.1086/317656
- Johnson, J. R., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Nougayrede, J. P., & Oswald, E. (2008). Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), 3906-3911. doi:10.1128/JCM.00949-08
- Johnson, J. R., Johnston, B. D., Porter, S., Thuras, P., Aziz, M., & Price, L. B. (2019). Accessory traits and phylogenetic background predict *Escherichia coli* extraintestinal virulence better than does ecological source. *Journal of Infectious Diseases*, 219(1), 121-132. doi:10.1093/infdis/jiy459
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Smith, K., O'Bryan, T. T., & Tatini, S. (2005). Antimicrobial-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Retail Foods. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(7), 1040-1049. doi:10.1086/428451
- Johnson, J. R., Murray, A. C., Gajewski, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowski, M. A., & Smith, K. E. (2003). Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(7), 2161-2168. doi:10.1128/aac.47.7.2161-2168.2003
- Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 383-404. doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.005
- Johnson, T. J., & Nolan, L. K. (2009). Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(4), 750-774. doi:10.1128/mmbr.00015-09
- Jouini, A., Vinué, L., Slama, K. B., Sáenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., Boudabous, A., Torres, C. (2007). Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5), 1137-1141. doi:10.1093/jac/dkm316
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140. doi:10.1038/nrmicro818
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12(1), 19-36. doi:10.1016/0147-619X(84)90063-5
- Kim, H. B., Wang, M., 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3582-3584. doi:10.1128/AAC.01574-08
- Kim, H. S., Chon, J. W., Kim, Y. J., Kim, D. H., Kim, M. s., & Seo, K. H. (2015). Prevalence and characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 83-86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.049
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*: FAO.
- Kroll, J., Klintner, S., Schneider, C., Voß, I., & Steinbüchel, A. (2010). Plasmid addiction systems: Perspectives and applications in biotechnology. In (Vol. 3, pp. 634-657).
- Krzywinski, M. I., Schein, J. E., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., Marra, M. A. (2009). Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*. doi:10.1101/gr.092759.109
- Köhler, C. D., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? In (Vol. 301, pp. 642-647).
- Leflon-Guibout, V., Heym, B., & Nicolas-Chanoine, M. H. (2000). Updated sequence information and proposed nomenclature for bla(TEM) genes and their promoters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(11), 3232-3234. doi:10.1128/AAC.44.11.3232-3234.2000

- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 3-32. doi:10.1007/82_2012_303
- Lescat, M., Clermont, O., Woerther, P. L., Glodt, J., Dion, S., Skurnik, D., Djossou, F., Dupont, C., Perroz, G., Picard, B., Catzeffis, F., Andremont, A., Denamur, E. (2013). Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 49-57. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00374.x
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Taylor, D. E. (1999). Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1523-1524.
- Liebana, E., Gibbs, M., Clouting, C., Barker, L., Clifton-Hadley, F. A., Pleydell, E., Davies, R. H. (2004). Characterization of β -Lactamases Responsible for Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strains from Food-Producing Animals in the United Kingdom. *Microbial Drug Resistance*, 10(1), 1-9. doi:10.1089/107662904323047745
- Livermore, D. M. (2008). Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect*, 14, 3-10.
- López-Saucedo, C., Cerna, J. F., & Estrada-García, T. (2010). Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Is the Most Prevalent Diarrheagenic *E. coli* Pathotype in Street-Vended Taco Dressings in Mexico City. *Clinical Infectious Diseases*, 50(3), 450-451. doi:10.1086/649888
- Lupo, A., Saras, E., Madec, J. Y., & Haenni, M. (2018). Emergence of bla CTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(4), 867-872. doi:10.1093/jac/dkx489
- Madec, J. Y., Haenni, M. (2018). Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. In (Vol. 99, pp. 72-81): Academic Press Inc.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock, Biología de Los Microorganismos* (10 ed.): Pearson Prentice Hall.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Health, W. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms (molecular typing *Neisseria meningitidis* housekeeping genes World-Wide Web hyper-virulent clones). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(March), 3140-3145.
- Maiden, M. C. J., Van Rensburg, M. J. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., & McCarthy, N. D. (2013). MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 728-736. doi:10.1038/nrmicro3093
- Mansan-Almeida, R., Pereira, A. L., & Giugliano, L. G. (2013). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiology*, 13(1), 1-1. doi:10.1186/1471-2180-13-22
- Markland, S. M., Lestrane, K. J., Sharma, M., & Kniel, K. E. (2015). Old Friends in New Places: Exploring the Role of Extraintestinal *E. coli* in Intestinal Disease and Foodborne Illness. *Zoonoses and Public Health*, 62(7), 491-496. doi:10.1111/zph.12194
- Marklund, B.-L., Tennent, J. M., Garcia, E., Hamers, A., Bdgá, M., Lindberg, F., Normark, S. (1992). Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* pap and prs pili operons as a

- mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties. *Molecular Microbiology*, 6(16), 2225-2242.
- Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., & Fauci, A. S. (2016). Antimicrobial resistance. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 316(11), 1193-1204. doi:10.1001/jama.2016.11764
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., & Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1568-1574. doi:10.1128/AAC.44.6.1568-1574.2000
- Merida-Vieyra, J., De Colsa- Ranero, A., Arzate-Barbosa, P., Arias- de la Garza, E., Méndez-Tenorio, A., Murcia-Garzón, J., & Aquino-Andrade, A. (2019). First clinical isolate of *Escherichia coli* harboring mcr-1 gene in Mexico. *PLoS ONE*, 14(4), 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0214648
- Mnif, B., Vimont, S., Boyd, A., Bourit, E., Picard, B., Branger, C., Arlet, G. (2010). Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1599-1603. doi:10.1093/jac/dkq181
- Mora, A., Dahbi, G., López, C., Mamani, R., Marzoa, J., Dion, S., Blanco, J. (2014). Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS One*, 9(1), e87025.
- Moran, R. A., Anantham, S., & Hall, R. M. (2019). An improved plasmid size standard, 39R861+. *Plasmid*, 102, 6-9. doi:10.1016/j.plasmid.2019.01.002
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. In (Vol. 28, pp. 648-656).
- Murray, I. A., & Shaw, W. V. (1997). O-Acetyltransferases for Chloramphenicol and Other Natural Products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(1), 1-6.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Microbiología Medica*: Elsevier.
- Müller, A., Stephan, R., & Nüesch-Inderbinen, M. (2016). Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Science of the Total Environment*, 541, 667-672. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.135
- Naeem, A., Badshah, S. L., Muska, M., Ahmad, N., & Khan, K. (2016). The Current Case of Quinolones : Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules*, 21(268). <https://doi.org/10.3390/molecules21040268>
- Nagy, B., Szmolka, A., Smole Možina, S., Kovač, J., Strauss, A., Schlager, S., Wagner, M. (2015). Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. *International Journal of Food Microbiology*, 209, 52-59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.026
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*, 11(1), 142-201.
- Navarro-Navarro, M., Moreno-Noriega, B. O., López-Munguía, B. E., Fragoso-Carmelo, M. d. C., & Sánchez-Padilla, J. A. (2005). Detección de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en el hospital infantil del estado de Sonora. *Bol Clín Hosp Infant Edo Son*, 22(2), 64-70.
- Navia, M. M., Ruiz, J., Sanchez-Céspedes, J., & Vila, J. (2003). Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(4), 295-298. doi:10.1016/S0732-8893(03)00062-2
- Nichols, K. B., Totsika, M., Moriel, D. G., Lo, A. W., Yang, J., Wurpel, D. J., Schembri, M. A. (2016). Molecular Characterization of the Vacuolating Autotransporter Toxin in

- Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 198(10), 1487-1498. doi:10.1128/jb.00791-15
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev*, 27(3), 543-574. doi:10.1128/cmr.00125-13
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Canica, M. M., Johnson, J. R. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, 61(2), 273-281. doi:10.1093/jac/dkm464
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological reviews*, 51(4), 381-395.
- O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final report and recommendations the review on antimicrobial resistance*. Retrieved from
- Ojdana, D., Sieńko, A., Sacha, P., Majewski, P., Wiecezorek, P., Wiecezorek, A., & Tryniszewska, E. (2018). Genetic basis of enzymatic resistance of *E. coli* to aminoglycosides. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 9-13. doi:10.1016/j.advms.2017.05.004
- Ojer-Usoz, E., González, D., & Vitas, A. I. (2017). Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from environmental, human and food samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7). doi:10.3390/ijerph14070676
- OMS. (2015). *Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria: Estimaciones de la OMS*. Retrieved from <http://www.who.int/foodsafety/es>
- OMS. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Retrieved from <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- OMS. (2019a). *El futuro de la inocuidad de los alimentos*. Retrieved from <https://www.who.int/es/food-safety/international-food-safety-conference>
- OMS. (2019b). *Inocuidad de los alimentos*.
- Oram, M., & Fisher, L. M. (1991). 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(2), 387-389. doi:10.1128/AAC.35.2.387
- Osborn, A. M., da Silva Tatley, F. M., Pickup, R. W., Saunders, J. R., & Steyn, L. M. (2000). Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology*, 146(9), 2267--2275. doi:10.1099/00221287-146-9-2267
- Padmini, N., Ajilda, A. A. K., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2017). Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: critical tools for antibiotic resistance pattern. In (Vol. 57, pp. 460-470): Wiley-VCH Verlag.
- Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., & Griffin, P. M. (2013). Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 407-415.
- Palomino, J., & Pachón, J. (2003). Aminoglucósidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(2), 105-115.
- Palzkill, T. (2018). Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5. doi:10.3389/fmolb.2018.00016
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3953-3955. doi:10.1128/AAC.00915-06
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. In (Vol. 18, pp. 657-686).

- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. In (Vol. 46, pp. 1-11).
- Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Brenner Michael, G., Hamprecht, A., Rieber, H., Hering, J. (2018). Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC Genomics*, 19(1). doi:10.1186/s12864-018-4976-3
- Pitout, J. D. D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. In (Vol. 3): Frontiers Research Foundation.
- Pérez-Pérez, F. J., & Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 2153-2162. doi:10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002
- Qrskov, F. and Orskov, I. (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*, 14, 43-112.
- Randall, L. P., Lodge, M. P., Elviss, N. C., Lemma, F. L., Hopkins, K. L., Teale, C. J., & Woodford, N. (2017). Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 283-290. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.036
- Rangel-Vargas, E., Gómez-Aldapa, C. A., Torres-Vitela, M. d. R., Villarruel-López, A., Gordillo-Martínez, A. J., & Castro-Rosas, J. (2015). Presence and Correlation of Some Enteric Indicator Bacteria, Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes, and Salmonella Serotypes in Alfalfa Sprouts from Local Retail Markets in Pachuca, Mexico. *Journal of Food Protection*, 78(3), 609-614.
- Rasko, D. A., Webster, D. R., Sahl, J. W., Bashir, A., Boisen, N., Scheutz, F., Waldor, M. K. (2011). Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic– Uremic Syndrome in Germany. *The New England Journal of Medicine*, 365(8), 709-717.
- Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K., & Whittam, T. S. (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 406(6791), 64-67. doi:10.1038/35017546
- Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 59-67. doi:10.1089/fpd.2006.3.59
- Robins-Browne, R. M., Holt, K. E., Ingle, D. J., Hocking, D. M., Yang, J., & Tauschek, M. (2016). Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. doi:10.3389/fcimb.2016.00141
- Rocha-Gracia, R., Ruiz, E., Romero-Romero, S., Lozano-Zarain, P., Somalo, S., Palacios-Hernández, J. M., Caballero-Torres, P., Torres, C. (2010). Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant qepA1 in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(1), 169-171. doi:10.1093/jac/dkp418
- Rodríguez, A. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475. doi:10.1590/S0036-36342002000500011
- Rogers, B. A., Sidjabat, H. E., & Paterson, D. L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 1-14. doi:10.1093/jac/dkq415
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in

- Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121-1137. doi:10.1093/jac/dkx488
- 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. doi:10.1093/jac/dkr548
- Runcharoen, C., Raven, K. E., Reuter, S., Kallonen, T., Paksanont, S., Thammachote, J., Chantratita, N. (2017). Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. *Genome Medicine*, 9(81), 1-11. doi:10.1186/s13073-017-0471-8
- Ryu, S. H., Lee, J. H., Park, S. H., Song, M. O., Park, S. H., Jung, H. W., Lee, Y. K. (2012). Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. *International Journal of Food Microbiology*, 159(3), 263-266. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.001
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect*, 12(1), 880-886. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x
- Sabaté, M., Prats, G., Moreno, E., Ballesté, E., Blanch, A. R., & Andreu, A. (2008). Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbiology*, 159(4), 288-293. doi:10.1016/j.resmic.2008.02.001
- Sainz E., T. del R., Reyes M., V., Vicente P., J., Serapio-Alva, R., Zárate, Martha Patricia Navarro, A., & Eslava C., C. (2008). Resistencia a antimicrobianos de cepas de *E. coli* de diversos serotipos aisladas de pacientes de un Hospital Psiquiátrico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(4), 18-25.
- Saldaña, Z., Sánchez, E., Xicohtencatl-Cortes, J., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2011). Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157: H7. *Frontiers in Microbiology*, 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00119
- Salverda, M. L. M., de Visser, J. A. G. M., & Barlow, M. (2010). Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: Experimental reconstruction and clinical relevance. In (Vol. 34, pp. 1015-1036).
- Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., & Top, E. M. (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 449-477. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00074.x
- Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J., & Karch, H. (1995). Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 33(3), 701-705.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. In (Vol. 28, pp. 519-542).
- Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. In (pp. 631-648).
- Sepehri, S., Khafipour, E., Bernstein, C. N., Coombes, B. K., Pilar, A. V., Karmali, M., Krause, D. O. (2011). Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(7), 1451-1463. doi:10.1002/ibd.21509
- Šeputiene, V., Povilonis, J., Ružauskas, M., Pavilonis, A., & Sužiedeliene, E. (2010). Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania. *Journal of Medical Microbiology*, 59(3), 315-322. doi:10.1099/jmm.0.015008-0

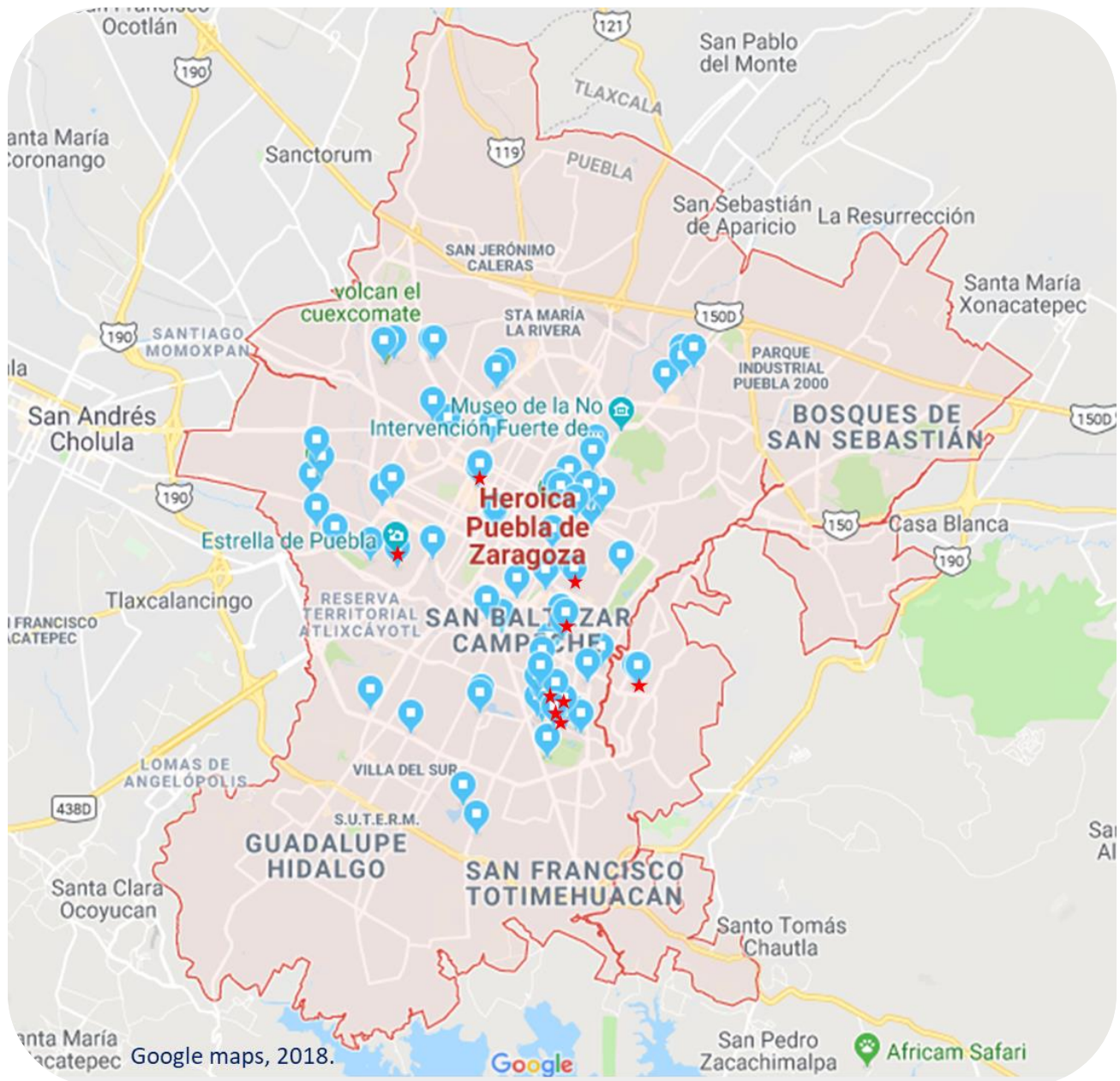
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434-452. doi:10.1128/MMBR.00020-10
- Smith, C., & Vaughn, S. (2013). *Antibiotic Resistance in Food-Borne Pathogens*. Retrieved from Washintong, DC:
- Smith, J. L., Fratafico, P. M., & Gunther, N. W. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(2), 134-163. doi:10.1089/fpd.2007.0087
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Mobley, H. L. T. (2012). *Escherichia coli* Isolates That Carry vat, fyuA, chuA, and yfcV Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infection and Immunity*, 80(12), 4115-4122. doi:10.1128/iai.00752-12
- Stenutz R., W. A., Widmalm G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *Escherichia coli* O-Antigen Database, from FEMS Microbiol. Rev.
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996-4001. doi:10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004
- Tadesse, D. A., Li, C., Mukherjee, S., Hsu, C.-H., Bodeis Jones, S., Gaines, S. A., Zhao, S. (2018). Whole-Genome Sequence Analysis of CTX-M Containing *Escherichia coli* Isolates from Retail Meats and Cattle in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 939-948. doi:10.1089/mdr.2018.0206
- Tagg, K. A., Francois Watkins, L., Moore, M. D., Bennett, C., Joung, Y. J., Chen, J. C., & Folster, J. P. (2018). Novel trimethoprim resistance gene dfrA34 identified in *Salmonella* Heidelberg in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(1), 38-41. doi:10.1093/jac/dky373
- Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Iwanaga, M. (2003). Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2669-2671. doi:10.1128/JCM.41.6.2669-2671.2003
- Torres, A. G. (2016). *Escherichia coli in the Americas*. USA: Springer.
- van Hoek, A. H. A. M., Veenman, C., van Overbeek, W. M., Lynch, G., de Roda Husman, A. M., & Blaak, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 1-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014
- Vargas, M., Gascón, J., Gallardo, F., Jimenez De Anta, M. T., & Vila, J. (1998). Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains detected by PCR in patients with travelers' diarrhea. *Clinical Microbiology and Infection*, 4(12), 682-688. doi:10.1111/j.1469-0691.1998.tb00652.x
- Veldman, K., Kant, A., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Wit, B., & Mevius, D. (2014). Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 72-77. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.014
- Vignoli, R., & Seija, V. (2006). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. In (pp. 649-662).
- Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., & Jimenez De Anta, M. T. (1996). Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2), 491-493.

- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. In (Vol. 40, pp. 437-463): Oxford University Press.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2518-2529. doi:10.1093/jac/dkq347
- Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., Carta, C., & Carattoli, A. (2012). Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the bla_{ndm-1}, bla_{ctx-m-15} and qnrB1 genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1645-1650. doi:10.1093/jac/dks114
- von Tippelskirch, P., Götz, G., Projahn, M., Daehre, K., Friese, A., Roesler, U., Orquera, S. (2018). Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in broiler chicken during slaughter in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 281, 82-89. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.022
- Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Lees, D. N. (2017). A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Research*, 126, 101-110. doi:10.1016/j.watres.2017.08.032
- Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., & Nishikawa, Y. (2017). Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 44-52. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11-19. doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.007
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136-1151. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- 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*, 18(1), 42-46. doi:10.1089/mdr.2010.0190
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12(2), 85-90. doi:10.1016/0928-8244(95)00053-A
- Yamane, K., Wachino, J. I., Suzuki, S., & Arakawa, Y. (2008). Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1564-1566. doi:10.1128/AAC.01137-07
- Yamasaki, S., Le, T. D., Vien, M. Q., Van Dang, C., & Yamamoto, Y. (2018). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and residual antimicrobials in the environment in Vietnam. *Animal Health Research Reviews*, 18(2), 128-135. doi:10.1017/s1466252317000160
- Zhang, J., Zheng, B., Zhao, L., Wei, Z., Ji, J., & Li, L. (2014). Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. *BMC infectious diseases*, 14, 659-659
- Zielenkiewicz, U., & Ceglowski, P. (2001). Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochimica Polonica*, 48(4), 1003-1023.
- Zurfluh, K., Nüesch-Inderbilen, M., Morach, M., Berner, A. Z., Hächler, H., & Stephan, R. (2015). Extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 3115-3120. doi:10.1128/AEM.00258-15

ANEXOS

ANEXO 1

Mapa de la localización de los establecimientos muestreados



Los globos azules indican la localización de los establecimientos muestreados en el estudio. Las estrellas rojas indican los establecimientos de los cuales se obtuvieron las cepas de *E. coli* del estudio.

ANEXO 2

Secuencias de iniciadores y condiciones de PCR

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la búsqueda de genes de resistencia

Reacción de PCR	Iniciadores (5' → 3')	Condiciones de amplificación	Amplicón (pb)	Referencia
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTXM-UNI-F: CGATGTGCAGTACCAGTAA CTXM-UNI-R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 30 seg. 52°C 30 seg. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	566	Batchelor <i>et al.</i> , 2005
<i>bla</i> _{CTX-M} Grupo 1	CTX-M13U: GGTTAAAAAATCACTGCGYC CTX-M13D: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	94°C 7 min. 1 ciclo 94°C 50 seg. 53°C 40 seg. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	843	Briñas <i>et al.</i> , 2005
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 2	CTX-M-2-F: ATGATGACTCAGAGCATTCG CTX-M-2-R: TCAGAAACCGTGGGTTAC	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 30 seg. 52°C 30 seg. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	876	Bertrand <i>et al.</i> , 2006
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 8	CTX-M-8-F: TGATGAGACATCGCGTTAAG CTX-M-8-R: TAACCGTCGGTGACGATTTT	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 30 seg. 52°C 30 seg. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	875	Jouini <i>et al.</i> , 2007
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 9	CTX-M-9-F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG CTX-M-9-R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	94°C 3 min. 1 ciclo 94°C 45 seg. 62°C 45 seg. 35 ciclos 72°C 45 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	857	Coque <i>et al.</i> , 2002
<i>bla</i> _{CTX-M} 3/15/22	CTXM3G-F: GTTACAATGTGTGAGAAGCAG CTXM3G-R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	94°C 7 min. 1 ciclo 94°C 50 seg. 57°C 40 seg. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	1018	Pagani, 2003
<i>bla</i> _{CTX-M} par de iniciadores usados para secuenciación	CTX-M13U: GGTTAAAAAATCACTGCGYC CTXM3GR: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	94°C 7 min. 1 ciclo 94°C 50 seg. 53°C 40 seg. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	885	Briñas <i>et al.</i> , 2005; Pagani, 2003
<i>bla</i> _{TEM}	TEM1-F: AGAGTATGAGTATTCAACATT TEM2-R: ATCTCAGCGATCTGTCTAT	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 50°C 1 min. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	837	Lee <i>et al.</i> , 2001

<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F: CACTCAAGGATGTATTGTG SHV-R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96°C 15 seg. 1 ciclo 96°C 15 seg. 52°C 15 seg. 24 ciclos 72°C 2 min. 72°C 3 min. 1 ciclo	883	Pitout <i>et al.</i> , 1998
<i>bla_{OXA}</i>	OXA-1: CCAAAGACGTGGATG OXA-2: GTAAATTTCGACCCCAAGTT	96°C 5 min. 1 ciclo 96°C 1 min. 61°C 1 min. 35 ciclos 72°C 2 min. 72°C 10 min. 1 ciclo	442	Briñas <i>et al.</i> , 2003
<i>bla_{CMY-2}</i> Externos	CMY-2F: GATTCCTTGGACTCTTCAG CMY-2R: TAAAACCAGGTTCCAGATAGC	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 45 seg. 53°C 30 seg. 35 ciclos 72°C 105 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	1855	Stapleton, <i>et al.</i> , 1999
<i>bla_{CMY-2}</i> Internos	CMY-2F: GCCGTTATCTACCAGGGAAAA CMY-2R: TTTTCAAGAATGCGCCAG	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 1 min. 63°C 30 seg. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	986	Ayala-Nuñez 2017
<i>qnrA</i>	QnrAm-F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG QnrAm-R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 1 min. 55°C 1 min. 40 ciclos 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 ciclo	580	Cattoir <i>et al.</i> , 2008
<i>qnrB</i>	QnrB-F: GGMATHGAAATTCGCCACTG QnrB-R: TTTGCGYYCGCCAGTCGAA	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 1 min. 56°C 1 min. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 ciclo	264	Cattoir <i>et al.</i> , 2008
<i>qnrS</i>	QnrSm-F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT QnrSm-R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 1 min. 56°C 1 min. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 ciclo	550	Cattoir <i>et al.</i> , 2008
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aac(6')-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 45 seg. 60°C 45 seg. 20 ciclos 72°C 45 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	482	Park <i>et al.</i> , 2006
<i>qepA</i>	QepA-F: GGACATCTACGGCTTCTTCG QepA-R: CTGCAGGTACTGCGTCATG	96°C 1 min. 1 ciclo 96°C 1 min. 60°C 1 min. 30 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	718	Yamane <i>et al.</i> , 2007; Rocha-Gracia <i>et al.</i> , 2010
<i>oqxA</i>	OqxA-F: CTCGGCGCGATGATGCT OqxA-R: CCACTCTTCACGGGAGACGA	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 15 seg. 63°C 30 seg. 35 ciclos 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 ciclo	392	Kim <i>et al.</i> , 2009

<i>oqxB</i>	OqxB-F: TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC OqxB-R: CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 45 seg. 64°C 45 seg. 32 ciclos 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 ciclo	512	Kim <i>et al.</i> , 2009
<i>gyrA</i>	GyrA-F: TACACCGGTCAACATTGAGG GyrA-R: TTAATGATTGCCGCCGTCGG	92°C 3 min. 1 ciclo 92°C 25 seg. 64°C 1 min. 32 ciclos 74°C 2.5 min. 72°C 3 min. 1 ciclo	648	Oram y Fisher, 1991
<i>parC</i>	ParC-F: AAACCTGTTCAGCGCCGCATT ParC-R: GTGGTGCCGTTAAGCAAA	94°C 3 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 55°C 1 min. 30 ciclos 72°C 1 min. 72°C 3 min. 1 ciclo	395	Vila <i>et al.</i> , 1996
<i>aac(3')-II</i>	aac(3')-II-F: ACTGTGATGGGATACGCGTC aac(3')-II-R: CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 30 seg. 60°C 45 seg. 32 ciclos 72°C 2 min. 72°C 8 min. 1 ciclo	237	Sáenz <i>et al.</i> , 2004
<i>sul1</i>	sul-1-F: TGGTGACGGTGTTTCGGCATT sul-1-R: GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 30 seg. 62°C 30 seg. 30 ciclos 72°C 1 min. 72°C 8 min. 1 ciclo	790	Mazel <i>et al.</i> , 2000
<i>sul3</i>	sul-3-F: GAGCAAGATTTTTGGAATCG sul-3-R: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCT TTGGA	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 51°C 1 min. 30 ciclos 72°C 1 min. 72°C 5 min. 1 ciclo	788	Sáenz <i>et al.</i> , 2004
<i>tetA</i>	TETA-1: GTAATTCTGAGCACTGTCGC TETA-2: CTGCCTGGACAACATTGCTT	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 30 seg. 62°C 30 seg. 23 ciclos 72°C 45 seg. 72°C 7 min. 1 ciclo	937	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000
<i>tetB</i>	TETB-1: CTCAGTATTCCAAGCCTTTG TETB-2: CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 30 seg. 57°C 30 seg. 25 ciclos 72°C 20 seg. 72°C 7 min. 1 ciclo	416	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000
<i>cmlA</i>	CmlA-F: TGTCATTTACGGCATACTCG CmlA-R: ATCAGGCATCCCATTCCCAT	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 55°C 1 min. 30 ciclos 72°C 1 min. 72°C 7 min. 1 ciclo	455	Sáenz <i>et al.</i> , 2004
<i>catA1</i>	catA1-F: CACTGGATATACCACCGTTG catA1-R: CACTCATCGCAGTACTGTTG	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 64°C 30 seg. 30 ciclos 72°C 45 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	630	Zanotto <i>et al.</i> , 2016

<i>aadA</i>	aadA-F: GTRCATTTGTACGGCTCYGC aadA-R: ACTACATTYCGCTCRTC GCC	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 58°C 1 min. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	470	Este estudio
<i>dfrA1/5/14</i>	dfrA1/5/14-F: GARCAGCTMCTBTTTAAAGC dfrA1/5/14-R: TTAACCTTTTTCARATTTG	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 52°C 1 min. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	393	Este estudio
<i>dfrA8/12</i>	dfrA8/12-F: ATGGGGCGMAAGACCTWTG dfrA8/12-R: TGWATATCTCAGCKCCRCC	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 64°C 1 min. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	205/184*	Este estudio
<i>dfrA7/17</i>	dfrA7/17-F: TCAGAAAATGGCGTAATCGG dfrA7/17-R: TCAACGTGAACAGTAGACAA	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 57°C 30 seg. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	335	Este estudio
<i>dfrB</i>	dfrB-F: GATCGCGTRCGCAAGAARTC dfrB-R: GGATAAATYTGBACYGARCC	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 1 min. 56°C 1 min. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 10 min. 1 ciclo	128	Este estudio

*Para esta reacción se pueden obtener 2 amplicones de diferente tamaño que corresponden a la variante 8 y 12 del gen *dfrA* respectivamente.

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la determinación del patotipo diarreogénico y búsqueda de PAIs de UPEC.

Patotipo	Iniciadores (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)	Referencia
ETEC	ST-I STI-F: TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG STI-R: CTTGACTTCTTCAAAGAGAAAATTAC	64	147	Vargas <i>et al.</i> , 1998
	ST-all STall-F: TTGTCTTTTTCACCTTTCCC STall-R: ACAAGCAGGATTACAACACA	60	93	Rodríguez-Ángeles, 2002
	LT LT-F: GGCGACAGATTATACCGTGC LT-R: CCGAATTCTGTTATAATATGTC	60	750	Gunzburg <i>et al.</i> , 1995
STEC	STx1 STX1-F: TTTACGATAGACTTCTCGAC STX1-R: CACATATAAATTATTTTCGCTC	55	227	Fratamico <i>et al.</i> , 1995
	STx2 STx2-F: CCCAGTCACGACGTTGTA STx2-R: TATACTATCGTGCCTTTCCA	60	460	Rodríguez-Ángeles, 2002

EPEC	EAF EAF-F: CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA EAF-R: TATGGGGACCATGTATTATCA	58	1087	Franke <i>et al.</i> , 1994
	bfpA bfpA-F: AATGGTGCTTGCCTTGCTGC bfpA-R: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	67	326	Gunzburg <i>et al.</i> , 1995
	eae eae-F: CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA eae-R: TCAGCGTGGTTGGATCAACCT	67	1087	Gannon <i>et al.</i> , 1993
EIEC	ial ial-F: CTGGATGGTATGGTGAGG ial-R: GGAGGCCAACAAATTATTTCC	60	320	Bassa <i>et al.</i> , 2010
DAEC	daaE daaE-F: TGAAGTGTGACCGAAGAGTGC daaE-R: TTAGTTCGTCCAGTAACCCCC	48	380	Mansan-Almeida <i>et al.</i> , 2013
EAEC	EAEC plásmido EAEC-F: CTGGCGAAAGACTGTATCAT EAEC-R: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	60	630	Schmidt <i>et al.</i> , 1995
PAI-I CFT073	RPAi: GGACATCCTGTTACAGCGCGCA RPAf: TCGCCACCAATCACAGCGAAC	65	925	Sabaté <i>et al.</i> , 2006
PAI-II CFT073	Cft073.2Ent1: ATGGATGTTGTATCGCGC Cft073.2Ent2: ACGAGCATGTGGATCTGC	55	400	Sabaté <i>et al.</i> , 2006
PAI-I J96	PapGlf: TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT PapGlr: TGGCATCCACATTATCG	57.7	400	Sabaté <i>et al.</i> , 2006
PAI-II J96	Hlyd: GGATCCATGAAACATGGTTAATGGG Cnf: GATATTTTGTGTCATTGGTTACC	59.3	2300	Sabaté <i>et al.</i> , 2006
PAI-I 536 ^a	I.9: TAATGCCGGAGATTCATTGTC I.10: AGGATTTGTCTCAGGGCTTT	55	1800	Sabaté <i>et al.</i> , 2006
PAI-II 536 _a	orf1up: CATGTCCAAAGCTCGAGCC orf1down: CTAGCTCAGGCTGGCTTTG	55	1000	Sabaté <i>et al.</i> , 2006
PAI-III 536 _b	sfaAI.1: CGGGCATGCATCAATTATCTTTG sfaAI.2: TGTGTAGATGCAGTCACTCCG	55	200	Sabaté <i>et al.</i> , 2006
PAI-IV 536 _b	IRP2FP: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC IRP2RP: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	55	300	Sabaté <i>et al.</i> , 2006

Todas las reacciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: 94°C 5 min. 1 ciclo, (94°C 1 min. Tm 1 min. 72°C 1 min.) 30 ciclos, 72°C 10 min. 1 ciclo. La temperatura de alineamiento usada para cada reacción fue la indicada en la tabla. ^a: PCR dúplex. ^b: PCR dúplex.

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la determinación del virotipo.

Reacción de PCR	Iniciadores (5' → 3')	Temp. alineamiento	Amplicón (pb)	Referencia
<i>iron</i>^a	IRON-F: AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG IRON-R: GACGCCGACATTAAGACGCAG	60°C	667	Johnson <i>et al.</i> , 2000
<i>cnf</i>^a	cnf-f: ATCTTATACTGGATGGGATCATCTTGG cnf-r: GCAGAACGACGTTCTTCATAAGTAT	60°C	974	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>afa/dra BC</i>^a	Afa-DraF: GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC Afa-DraR: CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	60°C	559	Johnson y Stell, 2000
<i>vatA</i>^b	vatA1076F: CCTGGGACATAATGGTCAGAT vatA1406R: CTGGCAATATTCACGCTACTG	61°C	330	Arenas-Hernández
<i>vatP</i>^b	vatP-86F: TAGCGCGCAATTCAACAATA vatP226R:GCAGATAGTGCCAGAGAGGTAAG	61°C	226	Arenas-Hernández
<i>papGII</i>^b		61°C	562	Arenas-Hernández
<i>kps-II</i>^c	kpsII-f: GATACGCCAACAGGGAAATG kpsII-r: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	63°C	272	Johnson y Stell, 2000
<i>kps-I</i>^c	KI-f: TAGCAAACGTTCTATTGGTGC kpsII-r: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	63°C	153	Johnson y Stell, 2000
<i>hlyA</i>^d		61°C	1280	Arenas-Hernández
<i>satP</i>^d		61°C	880	Arenas-Hernández
<i>satA</i>		57°C	384	Arenas-Hernández
Operon <i>afa</i>	AFA025-F: GAGTCACGGCAGTCGCGGCGG AFA025-R: TTCACCGGCGACCAGCCATCTCC	55°C	207	Blanco <i>et al.</i> , 2009
<i>cdtB</i>	cdtB-f: AACTGATTTTCGCGTTGCGA cdtB-r: GATACGCCAACAGGGAAATG	60°C	741	Barrios-Villa <i>et al.</i> , 2018
<i>ibeA</i>	IBEA10 F: AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC IBEA10 R: TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	60°C	170	Johnson y Stell, 2000
<i>papGIII</i>		61°C	421	Arenas-Hernández

^a: PCR triplex 1, ^b: PCR triplex 2, ^c: PCR dúplex 1, ^d: PCR duplex 2. Todas las reacciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min. 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 min. alineamiento por 30 seg. y elongación a 72°C por 1 min.) la temperatura de alineamiento se indica en la tabla y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 5 min.

Tabla 4. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la determinación del filogrupa (Clermont *et al.*, 2013).

Reacción de PCR	Iniciadores (5' → 3')	Condiciones de la reacción	Amplicón (pb)
Cuádruplex	<i>arpA</i> AceK.f: AACGCTATTCGCCAGCTTGC ArpA1.r: TCTCCCCATACCGTACGCTA	94°C 4 min. 1 ciclo 94°C 5 seg. 59°C 20 seg. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	400
	<i>chuA</i> chuA.1b: ATGGTACCGGACGAACCAAC chuA.2: TGCCGCCAGTACCAAAGACA		288
	<i>yjaA</i> yjaA.1b: CAAACGTGAAGTGTCTCAGGAG yjaA.2b: AATGCGTTCCTCAACCTGTG		211
	TspE4.C2 TspE4C2.1b: CACTATTCGTAAGGTCATCC TspE4C2.2b: AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		152
Grupo C	<i>trpA</i> trpAgpC.1: AGTTTTATGCCAGTGCGAG trpAgpC.2: TCTGCGCCGGTCACGCCC	94°C 4 min. 1 ciclo 94°C 5 seg. 59°C 20 seg. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	219
Grupo E	<i>arpA</i> ArpAgpE.f: GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC ArpAgpE.r: GAAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG	94°C 4 min. 1 ciclo 94°C 5 seg. 57°C 20 seg. 30 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 5 min. 1 ciclo	301
Control interno	<i>trpA</i> trpBA.f: CGGCGATAAAGACATCTTCAC trpBA.r: GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	Las mismas usadas para grupo C o E	489

Tabla 5. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la determinación del replicón de los plásmidos.

Reacción de PCR	Iniciadores (5' → 3')	Amplicón (pb)	Referencia
IncHI1¹	IncHI1-F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC IncHI1-R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
IncHI2¹	IncHI2-F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC IncHI2-R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644	
IncI1¹	IncI1-F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA IncI1-R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139	
IncX²	IncX-F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT IncX-R: TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC	376	
IncL/M²	IncL/M-F: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG IncL/M-R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785	
IncN²	IncN-F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG IncN-R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	
IncFIA³	IncFIA-F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG IncFIA-R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	Villa <i>et al.</i> , 2010, Carattoli <i>et al.</i> , 2005
IncFIB³	IncFIB-F: TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC IncFIB-R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	683	
IncW³	IncW-F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG IncW-R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
IncY⁴	IncY-F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG IncY-R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	765	
IncP⁴	IncP-F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA IncP-R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534	
IncFIC⁴	IncFIC-F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG IncFIC-R: TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT	262	
IncA/C⁵	IncA/C-F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA IncA/C-R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465	
IncT⁵	IncT-F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT IncT-R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750	
IncFII⁵	IncFII-F: CTGATCGTTTAAGGAATTTT IncFII-R: CACACCATCCTGCACTTA	258-262	Villa <i>et al.</i> , 2010
IncF*	IncF-F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG IncF-R: GAAGATCAGTCACACCATCC	270	Carattoli <i>et al.</i> , 2005
IncK	IncK/B-F: GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC IncK-R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160	
IncB/O	IncK/B-F: GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC IncB/O-R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159	

IncR	IncR-F: TCGCTTCATTCTGCTTCAGC IncR-R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	251	García-Fernández <i>et al.</i> , 2009
IncU	IncU-F: TCACGACACAAGCGCAAGGG IncU-R: TCATGGTACATCTGGGCGC	843	
IncColE	oricoIE-F: GTTCGTGCATACAGTCCA oricoIE-R: GGCGAAACCCGACAGGACT	187	
IncColET_p	oricoIE-F: GTTCGTGCATACAGTCCA oricoETP-R: GGTTTACCGGTGTCATTCC	106	
IncFIIy	IncFIIY-F: TGGYAGGGAAGTGGTTCTG IncFIIY-R: GTRAGTCACACCTTCCCGC	227	Villa <i>et al.</i> , 2010
IncFIIs	IncFIIs-F: CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC IncFIIs-R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC	259-260	
IncFIIk	IncFIIk-F: TCTTCTTCAATCTTGGCGGA IncFIIk-R: GCTTATGTTGCACRGAAGGA	142-148	
IncFIBs	IncFIBSF: TGCTTTTATTCTTAAACTATCCAC IncFIB-R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	683	Villa <i>et al.</i> , 2010, Carattoli <i>et al.</i> , 2005

¹: PCR triplex M1, ²: PCR triplex M2, ³: PCR triplex M3, ⁴: PCR triplex M4, ⁵: PCR triplex M5. Todas las reacciones excepto la PCR IncF simple, fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min. 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 min. alineamiento a 60°C por 30 seg. y elongación a 72°C por 1 min.), 1 ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. *La PCR IncF simple se llevó a cabo con el mismo programa, pero con una temperatura de alineamiento de 52°C.

Tabla 6. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la determinación de las relaxasas MOB (Alvarado *et al.*, 2012).

Reacción de PCR	Iniciadores (5' → 3')	Condiciones de PCR*	Amplificación (pb)
MOB-F11	F11-f: GCAGCGTATTACTTCTCTGCTGCCGAYGAYTAYTA F1-r: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	25 ciclos, 53°C	234
MOB-F12	F12-f: AGCGACGGCAATTATTACACCGACAAGGAYAAAYTAYTA F1-r: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	25 ciclos, 55°C	234
MOB-P11	P11-f: CGTGCGAAGGGCGACAARACBTAYCA P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTTCNGTRTC	25 ciclos, 60°C	180
MOB-P12	P12-f: GCACACTATGCAAAAGATGATACTGAYCCYGT P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTTCNGTRTC	30 ciclos, 53.8°C	189
MOB-P13	P13-f: AACCCACGCTGCAARGAYCCVGT P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTTCNGTRTC	30 ciclos, 59°C	180
MOB-P14	P14-f: CGCAGCAAGGACACCATCAAYCAYTAYRT P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTTCNGTRTC	25 ciclos, 50°C	174
MOB-P3	P3-f: CCGTGAGCCAAATCACACAGAATATKRTBTT P3-r: CGAAAGCCAACATGAACATGHGGATKHTC	25 ciclos, 50°C	177
MOB-P4	P4-f: GCGTTCAGGATGGTCYBTCSATGCC P4-r: CGGTTTTGACCGTCAGATGSVMATGCGG	25 ciclos, 64°C	163
MOB-P51	P51-f: TACCACGCCCTATGCGAARAARTAYAC P5-r: CCCTTGCTCCTGGTGYTSNACCCA	30 ciclos, 58°C	167
MOB-P52	P52-f: GATAGCCTTGATTTTAATAACACCAAYACYTAYAC P5-r: CCCTTGCTCCTGGTGYTSNACCCA	30 ciclos, 58°C	175
MOB-P53	P53-f: GGGCTCGCACGAYCAYACNGG P53-r: GCCCAGCCCTTTTCRTGRTTRTG	30 ciclos, 65°C	345
MOB-Q11	Q11-f: CAATCGTCCAAGGCGAARGCNGAYTA Q11-r: CGCTCGGAGATCATCAYYTGAYTG	30 ciclos, 50°C	331
MOB-Q12	Q12-f: CTGGAATATACTGAACACGGNAAYATGCC Q12-r: ATCCTTGGTGTAGCACGTTTRAARWAYTG	30 ciclos, 52°C	341
MOB-Qu	Qu-f: AGCGCCGTGCTGTCCGCBGNTAYCG Qu-r: CTCCGCAGCCTCGRCSGCRTTCCA	30 ciclos, 64°C	179
MOB-H11	H11-f: CCGGCGTCGGAGAAYCAYCAYCA H11-r: AAGGTCGTATACCTTYCCKGCRTRTG	**Touchdown PCR: comienza a 65°C $\Delta T_a = -1^\circ\text{C}$ por ciclo, 15 ciclos a 55°C	207
MOB-H121	H121-f: GCCAGCTTCCGAATCACAYCAYCAYCG H121-r: GTCGCTTGTCGCGCCACCGDATRAARTA	25 ciclos, 59°C	313

MOB-H2	H2-f: AGTTCCTCAGCCTCAGAAATCCAYCAYCAYKC H2-r: GCGGACCGTGCCANGGRTGCCA	25 ciclos, 68°C	264
MOB-C11	C11-f: GTCAGGTCAGCGTGTGGGGNCTNAC C11-r: CTCTTACGGTGCCCTCNACYTCRAA	**Touchdown PCR: start at 65°C ΔTa= -1°C por ciclo, 20 ciclos a 55°C	283
MOB-C12	C12-f: GCACGACTGGAAAAATATCGCTATGGGGNATHAC C12-r: CAACGTGATAATCCCGTCRGGVCGRTG	30 ciclos, 59°C	257

*Todas las reacciones de PCR, fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 4 min, 25-30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 seg. alineamiento por 30 seg. y elongación a 72°C por 30 seg.) la temperatura de alineamiento y los ciclos de cada PCR se indican en la tabla y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. **Las PCR MOB_{H11} y MOB_{C11} fueron realizadas usando un protocolo de touchdown para evitar la aparición de productos inespecíficos.

Tabla 7. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la determinación de SAP (Mnif *et al.*, 2010).

Reacción de PCR	Iniciadores (5' → 3')	Temp. de alineamiento*	Amplicón (pb)
pemKI	PemK-up: AACGAGAATGGCTGGATGC PemK-low: CCAACGACACCGCAAAGC	54°C	232
ccdAB	CcdA-up: AGGAAGGGATGGCTGAGGT CcdB-low: GGTAAAGTTCACGGGAGAC	54°C	230
relBE	RelE-up: AAAAACCCGATGGCGACAG RelE-low: TGATAGACCAGGCGAAAAC	57°C	370
parDE	ParD-up: ACGGACCAGCAGCACCAG ParE-low: AGCCCTTGAGCCTGTCTGG	58°C	534
vagCD	VagC-up: GGGACCTGGATTTTGATGG VagD-low: GAGCAGATGTTGGTGTCG	53°C	210
hok-sok	Hok-up: AGATAGCCCCGTAGTAAGTT Sok-low: GATTTTCGTGTCAGATAAGTG	54°C	203
pndAC	PndC-up: TCAATCAACCAGGGCTCT PndA-low: CCTCACCATCCAGACAAAA	52°C	140
srnBC	SrnB-up: ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT SrnC-low: CACCACTGTATTTCCCCTGT	54°C	171

*Todas las reacciones de PCR, fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 45 seg. alineamiento por 45 seg. y elongación a 72°C por 45 seg.) la temperatura de alineamiento se indica en la tabla y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 10 min.

ANEXO 3

Metodologías

Protocolo de extracción de ADN genómico por el kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification

1. Agregue 1 ml de un cultivo de toda la noche de incubación a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Centrifugar a $13,000\text{--}16,000 \times g$ durante 2 minutos para sedimentar las células. Retire el sobrenadante.
3. Agregue 600 μl de solución de lisis de núcleos. Pipetear suavemente hasta que las células se vuelvan a suspender.
4. Incubar a 80°C durante 5 minutos para lisar las células; Luego enfriar a temperatura ambiente.
5. Agregue 3 μl de solución de ARNasa al lisado celular. Invierta el tubo de 2 a 5 veces para mezclar.
6. Incubar a 37°C durante 15–60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
7. Agregue 200 μl de Solución de Precipitación de Proteínas al lisado celular tratado con RNasa. Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la Solución de Precipitación de Proteína con el lisado celular.
8. Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a $13,000\text{--}16,000 \times g$ durante 3 minutos.
10. Transfiera el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml que contiene 600 μl de isopropanol a temperatura ambiente. Nota: Puede quedar algo de sobrenadante en el tubo original que contiene el sedimento de proteínas. Deje este líquido residual en el tubo para evitar contaminar la solución de ADN con la proteína precipitada.
11. Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN formen una masa visible.
12. Centrifugar a $13,000\text{--}16,000 \times g$ durante 2 minutos.

13. Vierta cuidadosamente el sobrenadante y drene el tubo en papel absorbente limpio. Agregue 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente e invierta suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
14. Centrifugar a 13,000–16,000 × g durante 2 minutos. Aspirar cuidadosamente el etanol.
15. Vacíe el tubo en un papel absorbente limpio y deje que la pastilla se seque al aire durante 10–15 minutos.
16. Agregue 100µl de solución de rehidratación de ADN al tubo y rehidrate el ADN incubando a 65 °C durante 1 hora. Mezcle periódicamente la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidrate el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.
17. Almacenar el ADN a 2–8 °C.

Metodología de extracción de ADN plasmídico por el método de Kieser modificado (lisis alcalina).

A partir de un cultivo puro de las cepas, se inocularon 3 ml de calo LB y se incubaron en agitación a 150-200 rpm durante 18-24 horas a una temperatura de 37 °C. Posteriormente los tubos se colocaron en hielo durante 15 min.

Después se procedió a empastillar las células bacterianas por centrifugación a 13,000 rpm durante 5 min a temperatura de refrigeración de 4 °C (por falta de una centrifuga con refrigeración, se metió la centrifuga al refrigerador para generar esta condición) en tubos Eppendorf de 1.5 ml repitiendo este paso para poder obtener todas las células de los 3 ml de cultivo.

Después de obtener la pastilla bacteriana se le agregaron 400 µl de la solución 1 de lisis y se resuspendió la pastilla suavemente con ayuda de la micropipeta, después se le agregaron 100 µl de lisozima (10mg/ml) mezclando suavemente por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min.

Posterior a la incubación se le adicionaron 250 µl de la solución 2 de lisis y se mezcló en el vortex para después proceder a incubar a 55 °C durante 30 min. Después de la incubación se dejó enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente durante 5 min. Ya atemperada la solución, se le adicionaron 80 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

(25:24:1) y se mezcló con el vortex hasta obtener una solución blanquecina homogénea (2 min aprox.). Después se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm en 4 °C durante 20 min. y posteriormente se tomaron 600 µl del sobrenadante, cuidando de no tomar el sedimento que contiene las proteínas, y se colocaron en un tubo Eppendorf nuevo.

A continuación, se le agregó, a los 600 µl de sobrenadante, 300 µl de Acetato de Sodio (3M) y se mezcló el tubo por inversión suavemente hasta obtener una solución blanquecina homogénea y se incubó 10 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4 °C.

Después se transfirió el sobrenadante (500 µl aprox.) a un tubo Eppendorf nuevo, cuidando de no tomar el sedimento con la ayuda de una micropipeta. En los casos en los que se observó este sobrenadante con restos del sedimento se realizó de nuevo este mismo procedimiento para limpiar mejor la muestra.

Este sobrenadante donde se encuentra el ADN plasmídico se precipita con cantidad suficiente para completar un volumen de 1.5 ml con Etanol absoluto frío y se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20 °C por no menos de 20 min. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm a 4 °C durante 30 min. Después por decantación se elimina todo el alcohol cuidando de no perder la pequeña pastilla que se forma ya que contiene el ADN plasmídico. Esta pastilla se lava con Etanol al 70 % frío, agregando 500 µl y centrifugando a 13,000 rpm a 4 °C durante 20 min; por decantación se elimina todo el alcohol y se dejó secar el alcohol por completo dejando el tubo destapado en la campana de flujo (10-15 min.)

Después de que se aseguró que no quedaron restos de Etanol se agregaron directo a la pastilla 80 µl de agua estéril y se dejó rehidratar el ADN durante 1 hora a 37 °C o durante toda la noche a 4 °C.

Finalmente se procedió a cuantificar el ADN en el equipo NanoDrop 2000c y se corrieron 10 µl del ADN plasmídico ajustado a 100 ng/µl en un gel de agarosa al 0.7 % que después se tiñó con Bromuro de Etidio para visualizar las isoformas de los plásmidos presentes.

Protocolo para la purificación de los productos de PCR por el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit D4001.

Todos los pasos de centrifugación deben realizarse entre 10,000 - 16,000 x g.

1. Extraiga el fragmento de ADN del gel de agarosa con una cuchilla de afeitar, un bisturí u otro dispositivo, tratando de cortar la menor cantidad de gel posible, y transfíralo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Agregue 3 volúmenes de ADB a cada volumen de agarosa cortada del gel (por ejemplo, para 100 µl (mg) de gel de agarosa agregue 300 µl de ADB).
3. Incubar a 37 – 55 °C durante 5-10 minutos hasta que el gel se disuelva completamente, cuidar que la temperatura no exceda de los 60°C. Para los fragmentos de ADN > 8 kb, luego de la etapa de incubación, agregue un volumen adicional (igual al de la porción de gel) de agua a la mezcla para una mejor recuperación del ADN (por ejemplo, 100 µl de agarosa, 300 µl de ADB y 100 µl de agua).
4. Transfiera la solución de agarosa derretida a una columna Zymo-Spin™ en un tubo de recolección.
5. Centrifugar durante 30-60 segundos. Deseche los residuos colectados en el tubo mediante aspiración con micropipeta para evitar contaminar la muestra.
6. Agregue 200 µl de tampón de lavado de ADN a la columna y centrifugue durante 30 segundos. Deseche el residuo del lavado. Repita el paso de lavado.
7. Agregue ≥ 6 µl de DNA Elution Buffer o agua libre de ADNasa directamente a la matriz de la columna. Coloque la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml y centrifugue durante 30-60 segundos para eluir el ADN. Para mejorar la elución se puede aplicar el Buffer o agua a una temperatura de 60 – 70 °C y esperar 1 minuto antes de centrifugar.

El ADN ultrapuro ya está listo para su uso.

Metodología para la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (Cortés-Cortés, 2016)

Preparación de los insertos:

A partir de un cultivo puro crecido durante 24 horas en agar BHI, se realizó una suspensión en 1 ml de Buffer SE (75mM NaCl y 25mM EDTA, pH 8) hasta conseguir una absorbancia de 1.35-1.5 a 610 nm. Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad®) al 1.5% en tampón TE (10mM Tris y 1mM EDTA) y se mantuvo a 54°C. Se mezclaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa y se distribuyó en moldes (insertos). Se dejó solidificar unos minutos en refrigeración.

Lisis bacteriana:

Se emplearon 4 insertos por cepa, a los que se añadieron 4 ml de Buffer de lisis [50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®)] y se dejó incubar durante 24 h en baño María a 54°C.

Lavado de los insertos:

Tras eliminar el Buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados en baño María a 54°C, agregando:

- 3 ml de agua destilada estéril cada 10 min, tres veces.
- 3 ml de Buffer TE cada 10 min, dos veces.
- 3 ml de Buffer TE a temperatura ambiente, una vez.

Los insertos se conservaron en 3 ml de Buffer TE a 4°C hasta su utilización.

Digestión enzimática:

Se digirió medio inserto de cada cepa con la enzima S1. El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µl por tubo, a los que se añadieron 160 U/µl de enzima S1 (Fermentans Thermo Scientific®), 20 µl de Buffer 5X de la enzima y agua inyectable estéril. Se incubó por 40 min a temperatura ambiente.

Reacción:	Enzima S1:	1.6 µl
	Buffer 5X:	20 µl
	Agua:	<u>78.4 µl</u>
	Vol. Final:	100 µl

Transcurridos los 40 min de incubación, la digestión se detuvo colocando el inserto en un tubo con 150 µl de EDTA 0.5M y sarcosil ((N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck®) al 1% e incubando en hielo durante 10 min. Posteriormente los insertos se cargaron en el gel de agarosa al 1.2%, previamente secando con papel absorbente el exceso de sarcosil. La cepa de *E. coli* NCTC 50192 (39R861) se usó como cepa control, puesto que contiene 4 plásmidos de tamaño conocido: 155.8, 61.3, 40.1 y 6.8 kb (Moran *et al.*, 2019).

Preparación del gel de agarosa:

Se preparó un gel de agarosa certificada para campos pulsados (Bio-Rad®) al 1.2% disuelta en TBE 0.5X. Los pozos se rellenaron con los insertos, cargando en el primer y último pozo la cepa NCTC 50192; finalmente, los pozos se sellaron con agarosa a 50°C.

Electroforesis:

La electroforesis se realizó en una cámara de campos pulsados CHEF-DR II (BioRad®) con 2 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75µM (Merck®). El gradiente de voltaje fue 6 V/cm y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 seg durante 22 h a 14 °C.

Tinción del gel y visualización:

El gel se tiñó durante 10 min en una solución acuosa de 200 ml de BET (4 µg/ml) y se visualizó y digitalizó en el fotodocumentador MiniBIS Pro. El gel se destiñó en agua destilada, fotografiándose periódicamente hasta una correcta visualización.

Ensayos de conjugación

Para evaluar la transferencia horizontal de determinantes de resistencia de *E. coli* se llevaron a cabo ensayos de conjugación, siguiendo el procedimiento estandarizado en el LMHyC que se describe a continuación:

1. A partir de un cultivo puro de las cepas donadoras (cepas del estudio) y de la receptora (J53Rif^R) crecidas durante 24 h en placas de agar TSA, se inocularon en 5 ml de caldo BHI
2. se incubaron los tubos durante 24 h a 37°C en agitación.
3. En un matraz Erlenmeyer que contenía 20 ml de caldo LB, se mezclaron 250 µl de la cepa donadora y 1 ml de la receptora. Se incubó durante 24 h a 37 °C en agitación.
4. Se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} - 10^{-6} en 1 ml de caldo LB y se plaquearon 100 µl de cada una en placas con agar Mac Conkey para control de crecimiento, en Mac Conkey adicionado con Rif (100 µg/ml) para control de la cepa receptora, en Mac Conkey adicionado con CTX (2.5 µg/ml) para control de las cepas donadoras y en Mac Conkey adicionado con Rif (100 µg/ml) + CTX (2.5 µg/ml) para la selección de las cepas transconjugantes.
5. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C.
6. Se seleccionaron 2 colonias de posibles transconjugantes por cepa, (o en algunos casos 1 si crecía una sola colonia) y se sembraron en placas con agar Mac Conkey adicionado con Rif (100 µg/ml) + CTX (2µg/ml) para aislarlas y posteriormente conservarlas.
7. Las posibles cepas transconjugantes se guardaron a -70°C en viales con caldo BHI y glicerol al 10% para los estudios posteriores.

Preparación de soluciones

- **Stock de EDTA 0.5M pH= 8, para 100 ml**

Pesar 18.612 g de EDTA, disolver en 80 ml de agua destilada, en agitación con un pH alcalino entre 8 y 10 (el EDTA solo se disuelve a un pH alcalino), una vez disuelto el EDTA se ajusta a pH 8 con de NaOH 50% y HCL concentrado y se aforar a 100 ml con agua destilada, esterilizar a 15 libras por 15 minutos y conservar en refrigeración.

- **Stock de Tris 1M, para 100 ml**

Pesar 3.028 g de Tris, disolver en 90 ml de agua destilada en agitación y aforar a 100 ml con agua destilada, esterilizar a 15 libras por 15 minutos y conservar en refrigeración.

- **Stock de NaCl 5M, para 100 ml**

Pesar 58.44 g de NaCl, disolver en 400 ml de agua destilada, esterilizar a 15 libras por 15 minutos y conservar en refrigeración.

- **Stock de Sarcosil 20% (N-Lauroylsarcosine sodium salt), para 100 ml**

Pesar 20 g de sarcosil y disolver suavemente por inversión en 100 ml de agua destilada, conservar a temperatura ambiente.

- **Stock de Sacarosa 3M, para 100 ml**

Pesar 102.69 gr de sacarosa y disolver en 100 ml de agua destilada, esterilizar por filtración y conservar en refrigeración.

- **Stock de NaOH 5M, para 100 ml**

Pesar 20 gr de NaOH y disolver en 80 ml de agua destilada agregándola con cuidado (reacción exotérmica) y aforar a 100 ml con agua destilada, conservar a temperatura ambiente.

- **Buffer TAE 50X (Electroforesis de ADN)**

2M Tris, 1M ácido acético, 50mM EDTA pH 8

- *Preparación de Buffer TAE 50X, para 1L:*

Pesar 242.28 gr de Tris y disolverlos en 800 ml de agua destilada en agitación, usando el agitador magnético (la disolución de este componente es muy tardada incluso en agitación constante), después de disolver el Tris, agregar 57.1 ml de ácido acético glaciar (100%) y agregar 100 ml de EDTA 0.5M pH=8, mezclar con cuidado y aforar con agua destilada a 1L, esterilizar a 15 libras por 15 min y conservar en refrigeración.

- **Buffer TAE 1X (Electroforesis de AND)**

40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA pH= 8

- *Preparación de Buffer TAE 1X, para 1L:*

Tomar 20 ml de Buffer TAE 10X y aforarlos con agua destilada a 1L, conservar en refrigeración.

- **Buffer TBE 10X (PFGE)**

890mM Tris, 890mM ácido bórico, 20mM EDTA pH= 8

- *Preparación de Buffer TBE 10X, para 1L:*

Pesar 108 gr de Tris y 55 gr de ácido bórico y disolverlos en 900 ml de agua destilada estéril, en agitación usando el agitador magnético (la disolución de estos componentes es muy tardada incluso en agitación constante), agregar 40 ml de EDTA 0.5M pH=8 y aforar con agua destilada a 1L, conservar a temperatura ambiente.

- **Buffer TBE 0.5X (PFGE)**

44.5mM Tris, 44.5mM ácido bórico, 1mM EDTA pH= 8

- *Preparación de Buffer TBE 0.5X, para 1L:*

Tomar 50 ml de Buffer TBE 10X y aforarlos con agua destilada a 1L, conservar a temperatura ambiente.

- **Buffer TE (PFGE)**

10mM Tris y 1mM EDTA pH= 8

- *Preparación de Buffer TE, para 1L:*

Mezclar 10 ml de Tris 1M + 2 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 1L y esterilizar a 15 libras por 15 min.

- **Buffer SE (PFGE)**

75mM NaCl, 25mM EDTA, pH 8

- *Preparación de Buffer SE, para 100 ml:*

Mezclar 1.5 ml de NaCl 5M y 5 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 100 ml y esterilizar a 15 libras por 15 min.

- **Buffer de lisis (PFGE)**

50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH= 8, 1% sarcosil, 0.3 mg/ml proteinasa K.

- *Preparación de Buffer de lisis, para 100 ml*

Mezclar 5 ml de Tris 1M + 10 ml de EDTA 0.5M pH= 8 + 80 ml de H₂O y esterilizar a 15 libras por 15 min. Dejar enfriar y agregar 5 ml de sarcosil al 20%. Al momento de utilizar,

agregar 1.5 ml de proteinasa K 20 mg/ml (Thermo Fisher Scientific®) y mezclar por inversión.

- **Solución 1 de lisis (Extracción plasmídica)**

0.3 M sacarosa, 25 mM Tris, 25 mM EDTA pH= 8

- *Preparación de solución 1 de lisis, para 100 ml*

Mezclar 10 ml de sacarosa 3M con 2.5 ml de Tris 1M y 5 ml de EDTA 0.5M pH 8 y aforar a 100 ml con agua destilada, realizar la solución en condiciones de esterilidad y conservar en refrigeración.

- **Solución 2 de lisis (Extracción plasmídica)**

0.3M NaOH, 2% SDS (Sodium dodecyl sulfate)

Esta solución se prepara al momento ya que se precipita, por lo que se deben hacer los cálculos para la cantidad necesaria.

- *Preparación de solución de 2 lisis, para 10 ml*

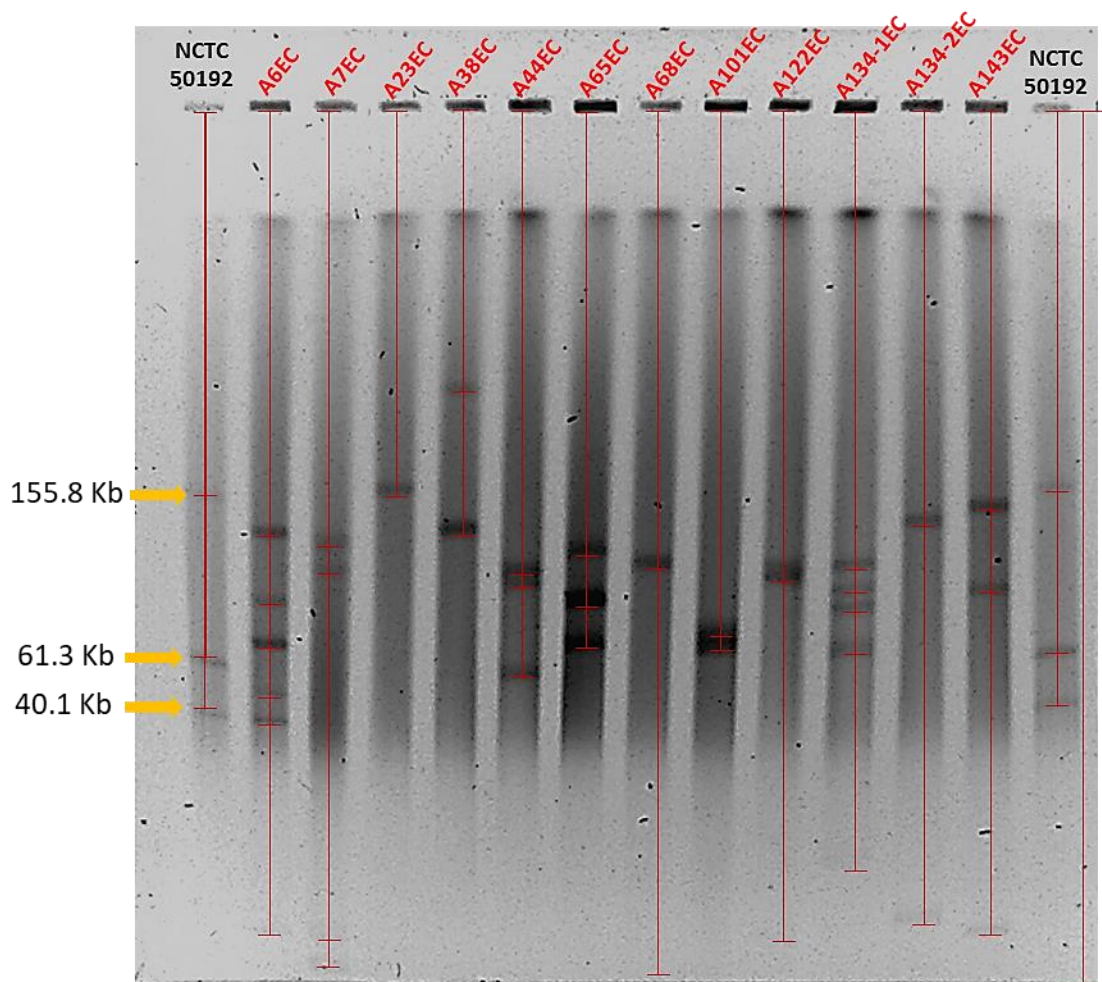
Pesar 0.2 gr de SDS y se disuelve en 9.4 ml de agua destilada estéril, después se agregan 600 µl de NaOH 5M, realizar la solución en condiciones de esterilidad y conservar a temperatura ambiente para que no se precipite.

ANEXO 4

Modelo estadístico para la determinación de los tamaños de los plásmidos

Modelo creado con el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.03

Imagen del corrimiento de los plásmidos mediante PFGE+S1 de la cual se obtuvieron las
movilidades relativas para el cálculo del tamaño.



Regresión Simple - Tamaño de plásmido (Kb) vs. Movilidad relativa

Variable dependiente: Tamaño de plásmido (Kb)

Variable independiente: Movilidad relativa

Raíz Cuadrada de Y: $Y = (a + b \cdot X)^2$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>		<i>M.A.D.</i>
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Estimación</i>
Intercepto	23.4219	0.0562689	416.249	0.0015	23.3981
Pendiente	-24.9695	0.0950971	-262.569	0.0024	-24.9227

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	20.5677	1	20.5677	68942.27	0.0024
Residuo	0.000298332	1	0.000298332		
Total (Corr.)	20.568	2			

Coeficiente de Correlación = -0.999993

R-cuadrada = 99.9985 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9971 por ciento

Error estándar del est. = 0.0172723

Error absoluto medio = 0.00900432

Estadístico Durbin-Watson = 2.83445 (P=)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.611483

Desviación Media Absoluta = 0.00884573

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo raíz cuadrada-Y para describir la relación entre Tamaño de plásmido (Kb) y Movilidad relativa. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Tamaño de plásmido (Kb)} = (23.4219 - 24.9695 \cdot \text{Movilidad relativa})^2$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Tamaño de plásmido (Kb) y Movilidad relativa con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.9985% de la variabilidad en Tamaño de plásmido (Kb) después de transformar a una escala logarítmica para linearizar el modelo. El coeficiente de correlación es igual a -0.999993, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.0172723. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones, seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0.00900432 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos.

El modelo también se ha ajustado usando un método más resistente a las observaciones aberrantes que el de mínimos cuadrados. Usando este método, la ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Tamaño de plásmido (Kb)} = (23.3981 - 24.9227 \cdot \text{Movilidad relativa})^2$$

Gráfico del Modelo Ajustado

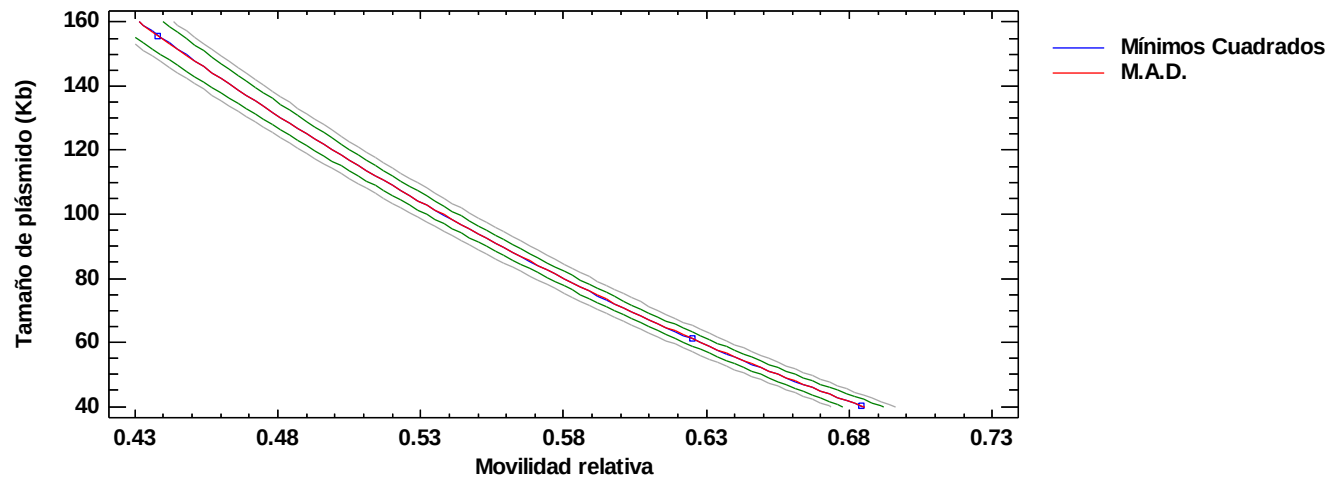
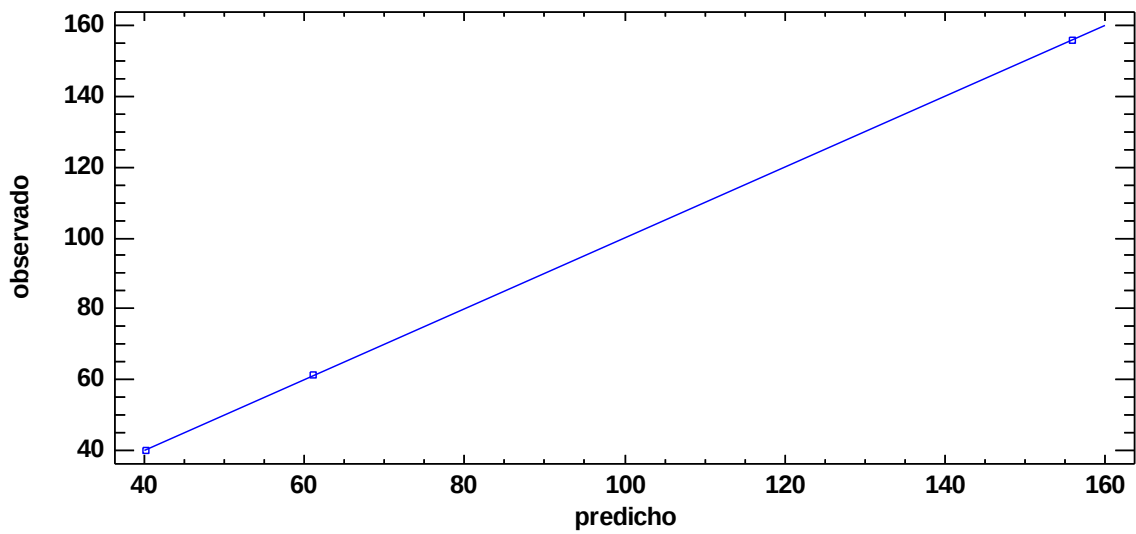


Gráfico de Tamaño de plásmido (Kb)



Valores Predichos

Cepa	No. de Plásmidos	Migración (cm)	Rf	Tamaño de plásmido (Kb)	Límite de predicción 95.00%		Límite de confianza 95.00%	
				Predicciones				
			X	Y	Inferior	Superior	Inferior	Superior
NCTC 50192	1	5.06	0.438	155.881	148.294	163.657	150.544	161.31
	2	7.21	0.625	61.0887	57.113	65.1981	58.969	63.2458
	3	7.89	0.684	40.2301	36.7369	43.882	38.0225	42.5
A6EC	1	5.63	0.488	126.265	120.097	132.587	122.463	130.124
	2	6.51	0.564	87.2182	82.5315	92.0343	84.8321	89.6373
	3	7.09	0.614	65.4576	61.3763	69.6704	63.3334	67.6169
	4	7.75	0.672	44.1209	40.5355	47.8582	41.9339	46.3635
	5	8.11	0.703	<40.1	31.091	37.9539	32.2071	36.7414
	6	10.89	0.944	<40.1				
A7EC	1	5.76	0.499	120.167	114.263	126.22	116.645	123.742
	2	6.11	0.529	104.305	99.0327	109.715	101.422	107.229
	3	10.96	0.95	<40.1				
	4	11.31	0.98	<40.1				
A23EC	1	5.09	0.441	154.016	146.524	161.694	148.783	159.339
A38EC	1	3.73	0.323	235.829	223.614	248.369	225.562	246.325
	2	5.62	0.487	126.826	120.634	133.174	122.999	130.713
A44EC	1	6.13	0.531	103.288	98.0528	108.659	100.44	106.175
	2	6.3	0.546	95.8151	90.8462	100.916	93.2078	98.4583
	3	7.49	0.649	52.0801	48.3129	55.9888	49.9356	54.2698
A65EC	1	5.86	0.508	115.291	109.589	121.137	111.98	118.65
	2	6.54	0.567	85.8246	81.1813	90.5971	83.4684	88.2137
	3	7.09	0.614	65.4576	61.3763	69.6704	63.3334	67.6169
A68EC	1	6.05	0.524	106.871	101.502	112.379	103.894	109.89
	2	11.4	0.988	<40.1				
A101EC	1	6.94	0.601	70.8155	66.5983	75.1622	68.666	72.9981
	2	7.12	0.617	64.2511	60.1994	68.4349	62.1295	66.4084
A122EC	1	6.21	0.538	99.7656	94.6584	105.007	97.0364	102.533
	2	10.97	0.951	<40.1				
A134-1EC	1	6.05	0.524	106.871	101.502	112.379	103.894	109.89
	2	6.34	0.549	94.3542	89.4351	99.405	91.7889	96.9548
	3	6.6	0.572	83.527	78.9536	88.2291	81.2159	85.8705
	4	7.15	0.62	63.0559	59.0331	67.2112	60.9358	65.2122
	5	10.02	0.868	<40.1	1.74271	4.73735	1.90614	4.47758
A134-2EC	1	5.48	0.475	133.665	127.163	140.328	129.505	137.89
	2	10.75	0.932	<40.1				
A143EC	1	5.27	0.457	144.259	137.255	151.438	139.555	149.042
	2	6.36	0.551	93.3865	88.4999	98.4044	90.8481	95.9599
	3	10.88	0.943	<40.1				

Esta tabla muestra los valores predichos para Tamaño de plásmido (Kb) usando el modelo ajustado. Además de las mejores predicciones, la tabla muestra:

- (1) intervalos de previsión del 95.0% para las nuevas observaciones
- (2) intervalos de confianza del 95.0% para la media de varias observaciones

Los intervalos de predicción y de confianza corresponden a las cotas internas y externas en la gráfica del modelo ajustado.