



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

**Identificación y caracterización de cepas de *Escherichia coli*
multidrogoresistentes productoras de betalactamasas de espectro extendido
aisladas de cilantro fresco**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA

José de Jesús García Pérez

DC. Rosa del Carmen Rocha Gracia

Directora de Tesis

DC. María Guadalupe Balbuena Alonso

Codirectora de Tesis

Mayo de 2025

Puebla, Pue.

Agradecimientos

Agradecimientos institucionales

- A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por el apoyo recibido durante la licenciatura y permitirme formar parte de esta casa de estudio.
- Al **Instituto de Ciencias**, por el apoyo brindado y disponibilidad para todas las gestiones y asuntos solicitados.
- Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas**, por acogerme en sus instalaciones y confiar en mi como alumno.
- Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC)**, por abrirme las puertas para poder desempeñar mi proyecto de investigación, por el aprendizaje de las técnicas utilizadas y por el excelente grupo de trabajo que me apoyo durante la realización de este estudio.
- Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología** por el apoyo dado bajo el proyecto con clave A1-S-22136.

Agradecimientos académicos

- A mi directora de tesis, **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por haberme aceptado e integrarme en su equipo de trabajo, por su función como guía en este arduo camino, por los buenos ratos en los que convivimos, por darme la oportunidad de conocer otros ambientes fuera del laboratorio, por darme la posibilidad de conocer a otros científicos de su mismo calibre, pero, sobre todo, por ser uno de las pilares que conformaron parte de mi formación académica y de investigación. Gracias, muchas gracias por todo doctora y espero haber cumplido sus expectativas.
- A mi codirectora de tesis, **D.C. María Guadalupe Balbuena Alonso**, por técnicamente haberme enseñado todo lo necesario para llevar a cabo este proyecto, cada paso que recorrí para completar este proyecto de tesis fue acompañado de ella. Sin duda, después de la doctora Rosy, le estoy infinitamente agradecido por su acompañamiento amigable y desinteresado. También le agradezco que me haya ofrecido su amistad y apoyo

incondicional, además de, en cierta forma, hacerme una mejor persona. Espero haber cumplido también sus expectativas y no haberla defraudado.

- A la **D.C. Patricia Lozano Zaráin**, por haberme dado sus consejos valiosos sobre como desempeñarme en el laboratorio, por nuestras convivencias, por también haber sido una de las docentes que formaron lo que soy ahora. Le estoy igualmente agradecido, espero también haber sido un buen integrante de lo que, en parte, también es su laboratorio, muchas gracias doctora.
- A la **D.C. Ana María Gonzales Villoria**, por ser parte fundamental en este estudio, por haberme ayudado muchas veces en la metodología y discutir los resultados que obtenía en este trabajo, además de darme consejos y apoyo.
- A los docentes que me apoyaron en este camino desde el eje básico de mi carrera hasta el eje de microbiología, la **D.C. Tania Araujo Reyes**, a la **D.C. Lucia Soto**, al **D.C. Ricardo Carreño**, al **D.C. Miguel Castañeda**, y especialmente a las doctoras **D.C. Cristina Lara Ochoa** y a **D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández**, por haberme enseñado y forjado mi camino a este increíble mundo de la microbiología.
- A todo el **equipo de trabajo y colaboradores del LMHyC**, pues gracias a su apoyo y esfuerzo, me ayudaron a concretar la parte del muestreo en tiempo y forma, la base de todo este proyecto.

Agradecimiento personales

- Sin duda alguna, agradezco primero a mi mamá **Nancy García Pérez**, y a mi tía **Margarita García Pérez**, que gracias a su sacrificio y su apoyo tanto económico como emocional, me han permitido cumplir un sueño forjado desde mi infancia y haber podido llegar a donde estoy ahora. Aún sigo forjando mi camino y espero que ustedes estén en él.
- A mi hermana, **Lic. María Cristina García Pérez**, por su apoyo incondicional y darme ánimos en mis momentos más difíciles en la carrera, te estoy muy agradecido por eso y mucho más.

- A mi tía, **Rosalva García Pérez**, por ser también un apoyo de mi tía Margarita y de mi mamá Nancy, sin ti, este proyecto tan grande no se hubiera podido concretar. Te estoy muy agradecido.
- A mi familia en general, a mi abuela “mamá” Mary, Luzma y Costa, gracias por estar presentes y preocuparse por mí.

Por último y no menos importante, a mis amigos: **Luis Mario, Cristian, Lorena Babines, Jessica Gómez, Alejandra Maldonado y María Balbuena**. Sin duda alguna este camino estuvo lleno de momentos tristes y felices, sin embargo, hay más recuerdos felices y todo gracias a ustedes, por haberme hecho parte de su grupo, por nuestras pláticas, nuestros juegos, nuestras salidas a restaurantes y, sobre todo, ofrecerme su amistad. Les estoy infinitamente agradecido por haber formado parte de este proyecto y parte de mi vida. A su vez les reclamo, porque se robaron parte de mi corazón.

**“La ciencia no tiene toda la verdad: es inacabable y avanza con los errores.
Pero, vencer los retos difíciles que impone, eso también es una fuente
inagotable de felicidad.”**

Julieta Fierro, 2024.

Tabla de contenido

I. Índice de tablas.....	7
II. Índice de figuras	7
1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	9
2.2. <i>Escherichia coli</i>	10
2.3. Antibióticos β -lactámicos.....	12
2.4. Resistencia a antibióticos.....	13
2.5. β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)	14
3. Antecedentes.....	18
3.1. Antecedentes Generales.....	18
3.2. Antecedentes específicos	21
4. Planteamiento del problema	22
5. Justificación	23
6. Hipótesis científica.....	24
7. Objetivos.....	24
7.1. Objetivo general	24
7.2. Objetivos Específicos.....	24
8. Material y métodos	25
8.1. Estrategia metodológica.....	25
8.2. Recolección de muestras.....	26
8.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo	26
8.3.1. Criterios de inclusión.....	26
8.3.2. Criterios de exclusión.....	26
8.3.3. Criterios de eliminación.....	27
8.4. Aislamiento de cepas	27
8.5. Identificación de cepas.....	27
8.6. Extracción de DNA por método de hervido	28
8.7. Amplificación del gen <i>ybbW</i>	28
8.8. Evaluación del perfil fenotípico de susceptibilidad antimicrobiana y producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	30
8.9. Determinación fenotípica de BLEE	30

8.10.	Búsqueda de genes que codifican BLEE	31
8.11.	Diseño estadístico.....	31
8.11.1.	Análisis de datos.....	31
8.11.2.	Hipótesis estadística	31
9.	Resultados.....	36
9.1.	Recolección de muestras de cilantro	36
9.2.	Determinación de la tasa de contaminación	36
9.3.	Distribución de la microbiota gram negativa y positiva.....	36
9.4.	Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	36
9.5.	Perfil de susceptibilidad y producción del fenotipo BLEE.....	38
9.6.	Identificación de genes que codifican para serín β -lactamasas (BLEE) .	41
10.	Discusión	44
11.	Conclusiones	53
12.	Perspectivas	54
13.	Referencias	55
14.	Anexos.....	69

I. Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación de la resistencia de las bacterias	14
Tabla 2: Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen <i>ybbW</i>	29
Tabla 3: Componentes para la amplificación del gen <i>ybbW</i>	29
Tabla 4: Antibióticos usados y puntos de corte	32
Tabla 5: Oligonucleótidos para identificación de serín β -lactamasas de espectro extendido	33
Tabla 6: Perfil de susceptibilidad y presencia del fenotipo BLEE de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de cilantro fresco	39

II. Índice de figuras

Figura 1: Clasificación de las β -lactamasas de espectro extendido según Ambler y Bush-Jacoby-Medeiros	17
Figura 2: Disposición de los sensidiscos de amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM) y cefotaxima (CTX) para identificación del fenotipo BLEE	30
Figura 3: Diagrama de caja y brazos de las tasas de contaminación por origen de las muestras de cilantro	37
Figura 4: Porcentaje de abundancia de las especies bacterianas gram negativas encontradas en cilantro	38
Figura 5: Placas representativas del sinergismo con AMC característico del fenotipo BLEE en las cepas 13C-1, 14C-1 y 32C-1	39
Figura 6: Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de cilantro fresco	41
Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra la presencia del gen bla _{CTX-M} (566 pb) en el panel A y bla _{CTX-M-15} (1018 pb) en el panel B	42
Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra la presencia del gen bla _{TEM} (837 pb) en el panel A y bla _{OXA} (442 pb) en el panel B	43

1. Resumen

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó que en Puebla se produjeron 3,536.5 toneladas de cilantro en 2023. El cilantro poblano ha estado relacionado con enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) principalmente en Estados Unidos. Además, reportes mencionan que genes asociados a resistencia a antimicrobianos (RAM) pueden transferirse entre bacterias comensales y patógenas. Tal es el caso de *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que se encuentra ampliamente diseminada limitando el uso de β -lactámicos y cefalosporinas. En México, *E. coli* se considera como un microorganismo indicador de contaminación fecal; sin embargo, su riesgo es subestimado, pudiendo llegar a la cadena de consumo y diseminar genes RAM o contribuir a ETAs de difícil tratamiento. En este estudio se recolectaron muestras de cilantro a conveniencia en restaurantes, verdulerías, mercados y supermercados. El género se confirmó mediante pruebas bioquímicas y se determinó la identidad de *E. coli* mediante el gen especie-específico *ybbW*. Se determinó el perfil de susceptibilidad a antibióticos y se identificó el fenotipo BLEE, además de determinar la presencia de genes BLEE: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} y *bla*_{SHV}. Se recolectaron un total de 80 muestras de cilantro de restaurantes (n=18), verdulerías (n=26), mercados (n=18), supermercados (n=14) y sin origen específico (n=4) y la tasa de contaminación en promedio fue de 6.38 log UFC/g. Se aislaron 162 cepas bacterianas de las cuales, 13 fueron *E. coli* las cuales se caracterizaron como multidrogoresistentes y mostraron producción de BLEE; el 92% de las cepas de *E. coli* presentaron el gen *bla*_{CTX-M}, siendo el 77% portadoras de la variante *bla*_{CTX-M-15}, 54% presentaron el gen *bla*_{TEM} y solo el 7.7% exhibió *bla*_{OXA}. Se concluyó que el cilantro recolectado fue contaminado con *E. coli* MDR productora de BLEE, siendo motivo de preocupación ya que pueden comportarse como bacterias patógenas de difícil tratamiento o bien diseminar genes RAM a través de elementos genéticos móviles. Nuestros resultados resaltan la necesidad de realizar la vigilancia y procedimientos epidemiológicos más estrictos que procuren la inocuidad de los alimentos y eviten la complicación de las ETAs de difícil tratamiento.

Palabras clave: Cilantro, coliformes, ETAs, *E. coli*, BLEE, genes RAM, MDR.

2. Introducción

2.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Se ha descrito frecuentemente que los alimentos contaminados con sustancias químicas, parásitos, virus y bacterias provocan anualmente un estimado de 600 millones de casos de enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados a nivel mundial, con más de 420 mil muertes prematuras, de las cuales más del 30% son de niños (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2022). Por su parte, en México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica registró en 2023 un aproximado de 23,000 casos de infecciones intestinales relacionadas al consumo de alimentos (INAPAM, 2023).

Las enfermedades provocadas por la ingesta de alimentos contaminados son conocidas como enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) que abarcan una amplia gama de enfermedades, los síntomas más frecuentes son manifestaciones gastrointestinales y generalmente son más comunes en los países de bajos y medianos ingresos (Grace, 2023). El problema de las ETAs en países de bajo y mediano ingreso es tan grande que es comparable con los casos asociados al VIH/SIDA, malaria o tuberculosis, además de provocar un costo anual estimado de 110 mil millones de dólares en productividad y gastos médicos. (OMS, 2022; Grace, 2023). Esta situación aunada a la globalización, permiten que nuevos riesgos emerjan; como la aceleración de la resistencia a antimicrobianos (RAM) en patógenos como *Campylobacter spp*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, entre otros (OMS, 2023; Heredia & Garcia, 2018) que terminen en la cadena del suministro alimentario a través del reúso de aguas de desecho, contaminación con heces animales o humanas de los cultivos, la manipulación de los alimentos, el proceso de preparación y su distribución (Contreras *et al.*, 2020; Monterrosa, 2018).

Por otra parte, en el 2019, el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA) mencionó que México está posicionado en el onceavo lugar de producción de alimentos a nivel global, ese mismo año se posicionó en el mismo lugar como productor de cultivos agrícolas

(CEDRSSA, 2020). Uno de los principales productos vegetales que se cultivan en México y se exportan es el cilantro, siendo Puebla el primer productor de este vegetal a nivel nacional, donde se cultivaron 3,536.55 toneladas en 2023 según el corte agrícola del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2024); dicha producción se encuentra en aumento y como lo menciona la OMS, esto conlleva el surgimiento de dificultades para mantener la inocuidad de los alimentos manifestándose en incidentes en el ámbito sanitario tanto de forma local como internacional debido a la globalización y la consecuente comercialización de alimentos (OMS, 2024). Además, debido a que el cilantro es un alimento consumido generalmente crudo, puede llegar a ser un potencial reservorio de bacterias como *E. coli* portadoras de genes de virulencia y resistencia a antimicrobianos.

2.2. *Escherichia coli*

Uno de los microorganismos que más se han relacionado a las ETAs es *Escherichia coli* (*E. coli*), la cual ha sido vinculada comúnmente a hospitalizaciones asociadas a la contaminación de alimentos en Estados Unidos (Center for Disease Control and Prevention [CDC], 2024), asimismo, en México se reportó como el principal microorganismo aislado causante de infecciones asociadas a infecciones intrahospitalarias (De León Rosales, 2023).

E. coli es una bacteria gram negativa de forma bacilar perteneciente a la clase Gammaproteobacteria y a la familia *Enterobacteriaceae* que bajo condiciones de crecimiento óptimas se multiplica aproximadamente en 20 minutos. Forma parte de la microbiota del intestino humano, de animales de sangre caliente y reptiles, siendo considerada como comensal (Leimbach *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2017). Además, esta bacteria se caracteriza por tener un genoma ampliamente variable entre cada cepa aislada, las técnicas de secuenciación han revelado una alta diversidad intra-especie, con solo aproximadamente 40% de sus proteínas conservadas entre todas las cepas. Este grupo conservado comprende alrededor de 2,200 genes que forman el genoma central, mientras que el 60% restante consiste en un grupo de genes prescindibles que se pueden transferir de manera horizontal, frecuentemente ubicados en elementos genéticos móviles como plásmidos, fagos e islas genómicas

responsables de las diversas adaptaciones y fenotipos dependientes del ambiente (Leimbach *et al.*, 2013).

Debido a la diversidad fenotípica y genotípica de las cepas comensales y patógenas de *E. coli*, pueden ser clasificadas mediante los antígenos somático (O), capsular (K) y flagelar (H), determinándose más de 700 serotipos (Jang *et al.*, 2017). Del mismo modo, *E. coli* también se puede clasificar según el esquema de Clermont que definen diez grupos filogenéticos, nueve de ellos (A, B1, B2, C, D, E, F, G y H) pertenecen al grupo *E. coli sensu stricto*, mientras que el décimo es *Escherichia* clado críptico I (Denamur *et al.*, 2021).

También, basados en las características de las cepas de *E. coli* como sus factores de virulencia, patogenicidad, tropismo del tejido, efectos sobre las células hospederas y síntomas clínicos pueden ser clasificadas en siete patotipos asociados a infecciones del tracto gastrointestinal, denominadas como *E. coli* diarreagénicas (DEC), estas son: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difuso-adherente (DAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), y *E. coli* adherente invasiva (AIEC). Particularmente el patotipo EHEC/STEC O157:H7 y el grupo no O157 se han vinculado frecuentemente con infecciones en el tracto gastrointestinal, estas tienen el potencial de provocar brotes de ETAs como ya se ha visto (Pokharel *et al.*, 2023; Mueller & Tainter, 2023).

Así mismo, encontramos patotipos extraintestinales (ExPEC) que incluyen a *E. coli* uropatogénica (UPEC), *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* causante de septicemia (SEPEC) y *E. coli* patógena aviar (APEC). Estas cepas se han asociado con infecciones del tracto urinario, bacteriemia, meningitis y sepsis (Pokharel *et al.*, 2023; Mueller & Tainter, 2023).

Finalmente, la amplia distribución mundial de la bacteria y al ser parte de la microbiota intestinal de una extensa variedad de animales ha provocado que las entidades encargadas de la seguridad sanitaria de muchos países tomen precauciones y consideren a *E. coli* como un indicador de contaminación y de riesgo potencial en alimentos y agua.

2.3. Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos son sustancias químicas de origen natural, semi-sintético o sintético que pueden detener el crecimiento de la bacteria (bacteriostático) o eliminar a la bacteria (bactericida) (Lima *et al.*, 2020). Se conocen múltiples familias de antibióticos: aminoglucósidos, fenicoles, fluoroquinolonas, glucopéptidos, macrólidos, polimixinas, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, entre otros; sin embargo, una de las familias que más destaca es la de los β -lactámicos (Hutchings *et al.*, 2019).

Los β -lactámicos son antibióticos bactericidas compuestos por un anillo β -lactámico (lo cual define a la familia) y otros radicales, estos últimos le conceden distintas propiedades químicas a los compuestos, formando grupos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de β -lactamasas; aunque, todos ejercen su mecanismo de acción en la síntesis de la pared celular de las bacterias, pues se unen de manera covalente al sitio activo de serina de las transpeptidasas, llamadas proteínas de unión a penicilina (PBPs) necesarias para la síntesis del peptidoglicano (Lima *et al.*, 2020; Suárez & Gudíol, 2009).

Estos medicamentos son algunos de los más prescritos a nivel mundial debido a sus propiedades farmacocinéticas, pues al poco tiempo de la administración alcanza la concentración bactericida mínima que se iguala a la concentración mínima inhibitoria, es decir, la cantidad mínima del antibiótico necesaria para eliminar al agente patógeno en un 99,9%. Aunado a lo anterior, los β -lactámicos son bien tolerados por la mayoría de la población (Suárez & Gudíol, 2009); sin embargo, el mal uso de los antibióticos en general por parte de las clínicas, el sector público y privado, farmacias y público en general ha provocado contaminación ambiental; inclusive, se ha reportado la presencia de residuos y metabolitos de antibióticos en cuerpos de agua, suelo, productos alimenticios como frutas, verduras e incluso la leche materna. Esta situación es alarmante debido al impacto que esta contaminación tiene sobre la población, alimentos, y más importante, sobre los microorganismos en general, pues la presencia de estos medicamentos, aún en bajas cantidades, provoca que se seleccionen bacterias con mecanismos moleculares que le permiten sobrevivir al efecto de los antibióticos (Bansal, 2022).

2.4. Resistencia a antibióticos

Las cepas de *E. coli* patógenas suelen ser eliminadas mediante antibioticoterapia; sin embargo, *E. coli* puede poseer características intrínsecas que permiten su sobrevivencia en presencia de algunos antibióticos. En las últimas décadas, la resistencia a antibióticos se ha vuelto en un tema sanitario de importancia internacional causando que las probabilidades de éxito al tratar una infección provocada por un patógeno con un antibiótico específico sean bajas (Baquero *et al.*, 2022).

Los principales mecanismos de resistencia a antimicrobianos son:

- Modificación de los antibióticos: este mecanismo se provoca mediante la producción de enzimas que adhieren grupos acetilos, adenilos o fosfatos al antibiótico, desactivándolo. Otra forma de inactivación es mediante la degradación del antibiótico a través de la unión de una enzima que provoca un ataque hidrofílico (Morrison & Zembower, 2020; Abushaheen *et al.*, 2020).
- Reducción de la acumulación intracelular: este mecanismo provoca la disminución de la permeabilidad de la membrana externa, disminuyendo el número de proteínas de membrana externa expresadas en la célula; también se da mediante el aumento de bombas de eflujo que transportan la sustancia tóxica al exterior de la bacteria (Morrison & Zembower, 2020; Abushaheen *et al.*, 2020).
- Alteración del sitio blanco de los antibióticos: este mecanismo incluye mutaciones o adherencia de grupos químicos en las proteínas en las que ejerce su acción el antibiótico, como lo son las PBPs o las topoisomerasas (Morrison & Zembower, 2020; Abushaheen *et al.*, 2020).
- Modificación de las vías metabólicas: también conocido como desvío o *bypass*, se refiere a estrategias que ocupa la bacteria para evitar la acción de los antibióticos mediante el desarrollo de nuevas vías para completar funciones bioquímicas (Morrison & Zembower, 2020; Abushaheen *et al.*, 2020; Munita & Arias, 2016).

La combinación de mecanismos de resistencia a antibióticos provoca la aparición de microorganismos que poseen desde una resistencia moderada a una extrema ante los tratamientos convencionales, es así como podemos clasificarlas de la siguiente forma:

Tabla 1: Clasificación de la resistencia de las bacterias		
Tipo de resistencia	Abreviación	Características
M ultid r ogoresistencia	MDR	Microorganismos resistentes al menos a un agente de tres o más familias de antibióticos
R esistencia e xtr e ma a d rogas	XDR	Microorganismos resistentes al menos a un agente de la mayoría de las familias de antibióticos; sin embargo, permanecen sensibles a una o dos categorías de antibióticos.
P and r ogoresistencia	PDR	Microorganismos resistentes a todos los antibióticos comerciales disponibles.

Información obtenida de Magiorakos *et al.*, 2012.

2.5. β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)

En las bacterias gram negativas, incluyendo la familia Enterobacteriaceae, pueden producir enzimas hidrolíticas llamadas β -lactamasas que descomponen el anillo β -lactámico de los antibióticos; este es el mecanismo de resistencia predominante en esta familia. Dentro de este grupo de enzimas, hay ejemplares que pueden inhibir la acción de la penicilina, aztreonam y oximinocetoximas de 3^{ra} y 4^{ta} generación, estas enzimas son llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y uno de sus principales productores es *E. coli*.

Estas enzimas pueden ser clasificadas según los esquemas de Ambler y Bush-Jacoby-Medeiros; según el esquema molecular o de Ambler, existen las clases moleculares que se diferencian por su estructura aminoacídica y el centro activo que poseen, así pues, se tienen las clases A, C y D que tienen un núcleo de serina, y la B que tiene un núcleo de zinc, conocidas como metalo- β -lactamasas. Por otro lado, tenemos el esquema funcional o de Bush-Jacoby-Medeiros, este se basa en que antibióticos degradan y cuales inhibidores tienen un efecto sobre cada β -lactamasas (De Angelis *et al.*, 2020; Husna *et al.*, 2023) (**Figura 1**).

Dentro de las BLEEs más importantes se encuentran CTX-M, TEM, SHV, pertenecientes a la clase molecular A y al grupo funcional 2, y OXA, que pertenece a la clase molecular D e igualmente al grupo funcional 2:

- CTX-M: Su nombre proviene de la abreviatura de cefotaximasa de Múnich y son las principales enzimas de resistencia ante oximinocefalosporinas, además de ser las de mayor distribución a nivel mundial, teniendo una mayor presencia en Europa, Asia y Sudamérica. La primera variante fue reportada a finales de 1980 y desde entonces se han encontrado más de 280 genotipos de esta familia teniendo solo el 6% de diferencia en la secuencia de aminoácidos. Estas se pueden clasificar filogenéticamente en 6 clústeres diferentes: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 y KLUC. Una de las variantes de mayor presencia es la CTX-M-15, perteneciente al clúster CTX-M-1, la cual confiere resistencia a ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona, aunado a ello, recientemente se reportó una variante derivada de CTX-M-15 (CTX-M-33) que ganó actividad de carbapenemasa (De Angelis *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2024).
- OXA: Las β -lactamasas OXA también conocidas como oxacilinasas fueron reportadas en 1976, estas pueden hidrolizar la oxacilina (de allí el prefijo oxa) y penicilina. Entre 1980 y 1990, se reportaron variantes de esta enzima en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* que podían conferir resistencia a cefalosporinas de 3^{ra} generación, desde entonces se han reportado más de 250 variantes de esta β -lactamasa, las cuales se han clasificado en grupos. Uno de los más importantes es el OXA-48-Like que confieren una mayor capacidad de hidrolizar monobactamas, cefalosporinas de 3^{ra} generación y carbapenémicos, este grupo en específico se ha diseminado con mayor frecuencia entre especies enterobacteriales como *Klebsiella* spp. y *E. coli* (Evans & Amyes, 2014).

- SHV: También llamadas reactivas de sulfhidrilo variable, fueron descritas por primera vez en 1985 en el cromosoma de *Klebsiella ozaenae* aislada en Alemania. Las principales variantes de SHV relacionadas con el fenotipo BLEE poseen mutaciones en la posición 238 donde se sustituye una glicina por una serina, y en la posición 240 donde se sustituye una lisina por una glutamina, estas mutaciones permiten la hidrólisis efectiva de las cefalosporinas de 3^{ra} generación, especialmente de la cefotaxima. Hasta 2021, se reportaron más de 200 variantes de esta proteína, siendo SHV-5 y SHV-12 las principales enzimas relacionadas a enterobacteriales (Castanheira *et al.*, 2021).
- TEM: Clase de enzimas reportada a inicios de la década de 1960 en un aislado de *E. coli* proveniente de un paciente griego llamado Temoneira. Estas enzimas adquieren notoriedad como respuesta a la introducción de las oximinocefalosporinas y monobactamas. Sus principales variantes son TEM-1 y TEM-2, esta última es la principal predecesora de las BLEEs que provocan resistencia expandida a otros antibióticos β -lactámicos. Las sustituciones de aminoácidos de mayor impacto son Gly238Ser y Glu240Lys debido a que se encuentran mayormente asociadas a la aparición del fenotipo BLEE. Actualmente son las BLEE de menor prevalencia a nivel mundial (Castanheira *et al.*, 2021).

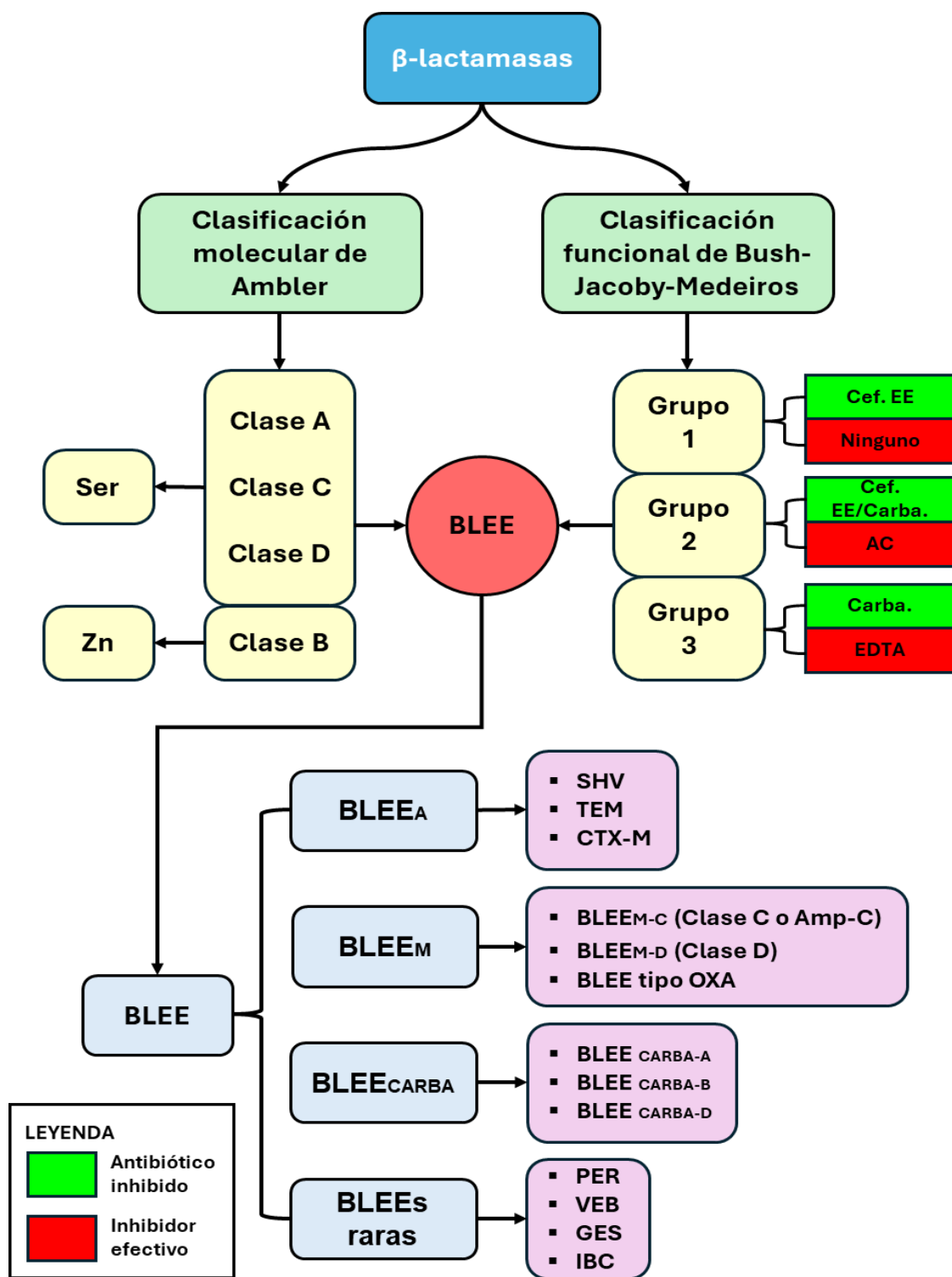


Figura 1: Clasificación de las β-lactamasas de espectro extendido según Ambler y Bush-Jacoby-Medeiros. Cef. EE: Cefalosporinas de espectro expandido; AC: ácido clavulánico; Carba.: carbapenémicos; EDTA: ácido tetra-acético diamino etileno; BLEE_A: pertenecen a la clase molecular de Ambler; BLEE_M: misceláneas o variadas; BLEE_{CARBA}: inhiben carbapenémicos. Figura extraída y modificada de Asmaul Husna (De Angelis *et al.*, 2020; Husna *et al.*, 2023).

3. Antecedentes

3.1. Antecedentes Generales

Como se mencionó, la mayoría de las cepas comensales de *E. coli* no representan un peligro microbiológico; sin embargo, se conoce la existencia de patotipos; otra de las características que *E. coli* posee es la plasticidad genómica inherente que le permite ganar genes de virulencia y/o resistencia a antimicrobianos y otros compuestos, lo que representa un importante riesgo a la salud pública.

Esta bacteria ha sido reportada en alimentos mínimamente procesados como lechuga, espinaca, nopal y cilantro, generalmente producto de la contaminación por desechos fecales animales y humanos proveniente de los desechos de rastros, uso de aguas negras en los cultivos o manipulación inadecuada, por lo que frecuentemente ha sido asociada con ETAs (Jang *et al.*, 2017), esto aunado al incremento en su tasa de resistencia a antibióticos ha generado que la Organización Mundial de la Salud (OMS) pondere a *E. coli* resistente a cefalosporinas de 3ra generación como uno de los microorganismos de prioridad crítica (OMS, 2024).

Uno de los mayores brotes de *E. coli* en la Unión Europea fue provocado por el consumo de brote de fenogreco en 2011, dicho brote fue uno de los de mayor importancia en Alemania. El incidente provocó más de 3000 casos en los 16 estados que conforman la república alemana, asimismo, se dio a conocer que 855 pacientes desarrollaron síndrome urémico hemolítico (SUH), de los cuáles, 18 fallecieron (Burger, 2012).

En relación con la problemática sobre cepas de *E. coli* MDR en productos vegetales frescos, durante 2015, Paredes y su equipo de trabajo realizaron un muestreo en Quito, Ecuador, donde recolectaron 27 muestras de frutas y vegetales listos para el consumo comercializados en el mercado municipal y reportaron la presencia de *E. coli* productora de BLEE en alfalfa, lechuga y cilantro (Paredes *et al.*, 2018).

Otro ejemplo de esta problemática son las numerosas infecciones asociadas al patotipo STEC, con más de dos millones de casos y 269 muertes durante el 2015; inclusive, la OMS y la FAO hacen hincapié en la importancia que tiene el serotipo de STEC/EHEC O157:H7 ya que está íntimamente relacionado con las

enfermedades transmitidas por alimentos; este serotipo puede provocar desde diarreas pasajeras hasta SUH, una infección que causa daño a nivel del sistema circulatorio, nervioso y renal que puede llevar a la muerte (Food and Agriculture Organization [FAO] & OMS, 2018). Asimismo, el patotipo ETEC fue el causante de más de 222 millones de casos a nivel mundial con un aproximado de 51,000 muertes en 2016, por lo que se le atribuyen cerca del 3.2% de las muertes causadas por diarrea a nivel global. Estos datos posicionan a dichos patotipos de *E. coli* asociados a alimentos como algunos de los principales patógenos causantes de diarrea a nivel mundial (Khalil *et al.*, 2018).

Durante el 2018, se reportó la presencia de *E. coli* tanto en investigaciones con vegetales frescos como en brotes a nivel mundial; un ejemplo de ello fue un importante brote ocasionado por el consumo de alimentos contaminados por esta bacteria en Estados Unidos, el cual estuvo vinculado a lechuga romana; se contabilizaron 62 casos y 25 hospitalizaciones (Chen *et al.*, 2023; CDC, 2019). En India, durante el 2018, Priyanka y colaboradores recolectaron perejil, cilantro y yerbabuena de las áreas urbanas. Los resultados mostraron la presencia de los patotipos EAEC, EHEC, EPEC y EIEC resistentes a múltiples clases de antibióticos, principalmente a β -lactámicos (Priyanka *et al.*, 2021). En Alemania, también en 2018, Freitag y colaboradores recolectaron 245 muestras de vegetales y reportaron la presencia de siete cepas de *E. coli* productoras de BLEE, las cuáles poseían diversas variantes de la familia blaCTX-M (Freitag *et al.*, 2018). Ese mismo año, en Estados Unidos, Zhang y su equipo recolectaron lechuga convencional, lechuga romana y espinaca en varios estados; sus resultados mostraron la presencia de *E. coli* O157:H7 y STEC no O157:H7 resistentes; además de otros microorganismos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* con una prevalencia menor al 0.12% (Zhang *et al.*, 2018).

Recientemente, en 2020 en Corea del Sur, Song y colaboradores recolectaron 1,324 vegetales frescos; en dicho estudio se reportó la presencia de 11 cepas de *E. coli* MDR que portaban alguna variante de la β -lactamasa CTX-M (Song *et al.*, 2020). Por otro lado, en 2021, Lee y su equipo de trabajo recuperaron 180 muestras de

lechuga y frijoles provenientes de mercados en Malasia, de las cuales se recuperaron 15 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, de las cuales nueve presentaron multidrogoresistencia (Lee *et al.*, 2021). Finalmente, en mayo de 2024, en Reino Unido se reportó un brote de STEC O145 proveniente de lechuga contaminada en sándwiches empaquetados, que provocó múltiples hospitalizaciones y una muerte ocasionada por el desarrollo del síndrome urémico hemolítico (UK Health Security Agency, 2024).

En cuanto a investigaciones hechas en México, tenemos que, en 2016, en el estado de Hidalgo, Aldapa y colaboradores realizaron un muestreo de nopales encontrando la presencia de *E. coli* MDR y los patotipos diarrogénicos STEC, ETEC y EPEC. Las nueve cepas de *E. coli* recuperadas fueron resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico, amikacina, colistina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, neomicina y estreptomicina (Gómez-Aldapa *et al.*, 2016).

Por su parte, Guevara y colaboradores en 2019 realizaron una revisión de datos provenientes del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE. UU. Esta revisión incluía todos los brotes entre 2006 y 2018 asociados a diferentes serotipos de *E. coli* en varios productos vegetales listos para el consumo como lechuga romana, alfalfa y verduras de hoja verde; que tuvieron como resultados 638 casos clínicos, múltiples hospitalizaciones y nueve muertes (Luna-Guevara *et al.*, 2019).

A pesar de que *E. coli* es una bacteria comúnmente relacionada con enfermedades diarreicas y otras infecciones como lo han reportado varios equipos de trabajo alrededor del mundo, en México solo se considera como un indicador de contaminación de alimentos y agua, por ello, la información acerca de brotes de *E. coli* relacionada a ETAs en la población mexicana es limitada.

3.2. Antecedentes específicos

Entre 2012 y 2015, la Administración de Alimentos y Medicamentos en EE. UU (FDA) llevó a cabo múltiples investigaciones sobre la relación entre la presencia de *Cyclospora cayetanensis*, un protozoo intestinal que puede provocar ciclosporiasis, y la contaminación del cilantro poblano. La FDA determinó que el producto se manejaba bajo condiciones insalubres y, aunque los brotes de ciclosporiasis no hayan sido provocados por una sola casa empacadora o distribuidora específica, se debían aplicar restricciones importantes sobre el cilantro proveniente de Puebla. Una de las condiciones que se implementó para la exportación del cilantro poblano a Estados Unidos es indicar claramente la ausencia de organismos contaminantes de origen fecal, entre ellos *E. coli*. Esta situación ha ocasionado que el cilantro poblano tenga serios obstáculos para lograr su exportación en la actualidad, ocasionando pérdidas económicas de gran importancia para los productores (FDA, 2022).

En nuestra localidad, en 2019, Carreón-León recolectó en la ciudad de Puebla 143 muestras de vegetales crudos, entre ellos cilantro y aisló 12 cepas de *E. coli* MDR identificadas molecularmente mediante el gen especie-específico *ybbW* el cual codifica para una proteína transportadora putativa de alantoína que moviliza del medio extracelular al intracelular la alantoína para convertirla en amonio como fuente de nitrógeno (Walker *et al.*, 2017; Rodionova *et al.*, 2023), de las cuales 10 presentaron el fenotipo BLEE. Aquellas cepas que presentaron el fenotipo BLEE exhibieron el gen *bla*_{CTX-M-15}, las dos carentes de este fenotipo mostraron la presencia del gen *bla*_{CMY-2}. Por otra parte, el gen *bla*_{TEM} estuvo presente en cinco de las cepas, cuatro a la par presentaron el fenotipo BLEE. Por último, el gen *bla*_{OXA-1} fue albergado únicamente en una cepa (Carreón-León, 2019).

4. Planteamiento del problema

La bacteria *Escherichia coli* es uno de los principales microorganismos relacionados con ETAs a nivel mundial. Específicamente en México, se encuentra limitada la información acerca de este patógeno y su relación con ETAs asociadas al consumo de cilantro. Debido a que *E. coli* es una bacteria ubicua, comúnmente es reportada en diversos nichos ecológicos junto con otras bacterias coliformes fecales, además, a causa de la transferencia horizontal de genes, *E. coli* puede aceptar genes de resistencia y transferirlos a otras bacterias.

En países desarrollados se cuenta con un sistema de monitoreo y vigilancia de la susceptibilidad a antibióticos de *E. coli* en cepas de origen alimentario; sin embargo, en México, únicamente representa un indicador de calidad sanitaria. Esto resalta la necesidad de un sistema que permita evaluar el potencial de los alimentos frescos como un vehículo de cepas MDR productoras de BLEE que puedan generar ETAs de difícil tratamiento causadas por bacterias resistentes a antibióticos.

Por todo lo anterior se plantea que los alimentos crudos como el cilantro pueden funcionar como vehículos y/o reservorios de bacterias frecuentemente relacionadas con enfermedades transmitidas por alimentos como es *E. coli* la cual puede poseer mecanismos de resistencia que le confieran una baja susceptibilidad a antibióticos y posteriormente a través de elementos genéticos trasladarlos a otras bacterias de diferentes géneros.

5. Justificación

En el estado de Puebla se produjeron más de 3,000 toneladas de cilantro en el 2023, posicionándose como el primer productor de cilantro a nivel nacional; sin embargo, este producto, junto con otros vegetales frescos mínimamente procesados, han sido frecuentemente vinculados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) esto debido a los procedimientos de lavado y desinfección ineficientes, la contaminación de suelos y del agua de riego. Además, estos alimentos pueden funcionar como vehículos idóneos de bacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos que potencialmente puedan transferirse a otras bacterias comensales y patógenas. Una de las principales bacterias relacionadas a ETAs es *E. coli*, dicho microorganismo es considerado como un factor de contaminación importante en vegetales crudos; sin embargo, no es considerado como un patógeno por sí mismo sino únicamente como un indicador de calidad sanitaria. Aunado a esto, se han reportado frecuentemente cepas de *E. coli* comensales y patógenas que poseen mecanismos de virulencia y resistencia a antibióticos β -lactámicos, resaltando las BLEE, enzimas que hidrolizan múltiples antibióticos de esta familia. Lo anterior es preocupante ya que las instituciones de vigilancia sanitaria en México generan información limitada respecto a la presencia de *E. coli* en alimentos de hoja verde y su susceptibilidad frente a diversas familias de antibióticos. A pesar de que existen leyes que obligan a las empresas empacadoras a llevar a cabo procesos de desinfección que garanticen la inocuidad del producto, la carga bacteriana residual del vegetal podría estar integrada por bacterias MDR, que puedan transferir genes de resistencia a antibióticos de cepas comensales a otras cepas diarreagénicas o extraintestinales que causen enfermedad y provoquen que los tratamientos farmacológicos no sean efectivos. En este estudio se analizaron muestras de cilantro poblano fresco para determinar su calidad sanitaria. Asimismo, se determinó la presencia de cepas de *Escherichia coli*, su perfil de susceptibilidad a antibióticos y el fenotipo de producción de β -lactamasas de espectro extendido, así como la ausencia o presencia de los genes asociados a la resistencia a β -lactámicos.

6. Hipótesis científica

El cilantro comercializado en la ciudad de Puebla es un reservorio de cepas de *E. coli* multidrogoresistente productoras de serín β -lactamasas de espectro extendido.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

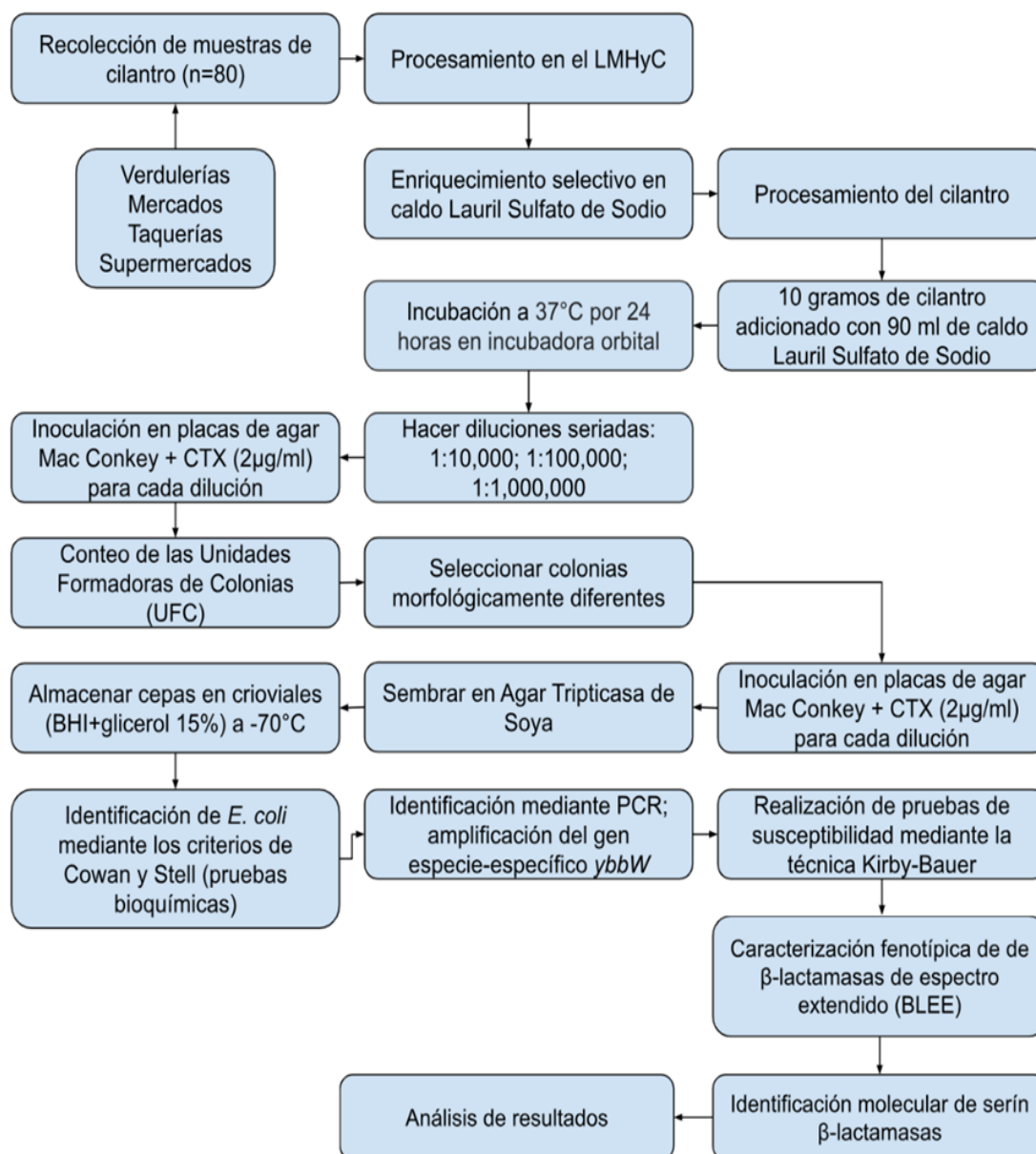
- Identificar y caracterizar cepas de *E. coli* multidrogoresistentes (MDR) productoras de serín β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de cilantro fresco.

7.2. Objetivos Específicos

- Determinar el número de unidades formadoras de colonias/g de muestra de cilantro potencialmente resistentes a cefotaxima.
- Aislar e identificar cepas de *E. coli* potencialmente resistentes a cefotaxima, a partir de muestras de cilantro fresco.
- Determinar el perfil de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* aisladas de cilantro fresco.
- Caracterizar fenotípicamente la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en las cepas de *E. coli*.
- Identificar genes que codifican para serín β -lactamasas en las cepas de *E. coli*.

8. Material y métodos

8.1. Estrategia metodológica



8.2. Recolección de muestras

Se realizó una recolección a conveniencia de muestras de cilantro fresco listo para su consumo a partir de verdulerías, taquerías, mercados y supermercados; cada muestra fue puesta en bolsas estériles con sellado y puestas en una hielera a una temperatura aproximada a 7°C para su transporte al laboratorio para su proceso. Los datos para cada muestra: número de muestra, fecha de recolección, localización, evidencia fotográfica y observaciones, fueron recolectados mediante la aplicación epicollect5 (BIG DATA INSTITUTE, University of Oxford, Wellcome).

8.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo

8.3.1. Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio muestras de cilantro fresco a partir de establecimientos de la ciudad de Puebla. Las muestras estaban separadas en bolsas estériles para evitar la contaminación cruzada y marcadas por un número asignado con anterioridad.

Para la selección de las colonias se tomaron en cuenta aquellas que cumplieron con las características específicas de *E. coli*: colonias circulares con bordes lisos y brillantes, lactosa positiva, gram negativas de forma bacilar y que sobrevivan a cefotaxima a una concentración de 2µg/ml.

8.3.2. Criterios de exclusión

Se excluyeron las muestras que no estaban en bolsas debido al alto riesgo de contaminación cruzada durante el traslado al laboratorio.

Aquellas bacterias que no fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas y molecularmente como *E. coli* fueron excluidas del estudio.

8.3.3. Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio las muestras que se encontraron en mal estado, es decir, que presentaron una coloración café o negruzca, sinónimo de descomposición del vegetal.

Aquellas cepas que estuvieron contaminadas por otros microorganismos en agar soya tripticaseína y que no se desarrollaron en agar MacConkey suplementado con cefotaxima a una concentración de 2µg/ml fueron eliminadas del estudio.

8.4. Aislamiento de cepas

Se colocaron 10 g de cada muestra en 90 ml de caldo lauril sulfato de sodio (BD Bioxon) y se incubaron a 37°C a 30 rpm por 24 horas. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas (1:10,000; 1:100,000; 1:1,000,000) y se inocularon en placas de agar MacConkey (MCD Lab) adicionado con 2 µg/ml de cefotaxima (CTX) para obtener las UFC/g de cepas potencialmente resistentes a β-lactámicos. Después del periodo de incubación se seleccionó la placa contable a partir del número de colonias observadas. Los conteos fueron expresados en log₁₀. Posteriormente, se sembraron en agar Mac Conkey las colonias morfológicamente diferentes, para finalmente seleccionar las colonias morfológicamente semejantes al fenotipo de *E. coli* y se sometieron a los criterios de Cowan y Stell (Barrow & Feltham, 2004), y después se les amplificó el gen especie-específico *ybbW*, para su identificación (Walker *et al.*, 2017). Las cepas de *E. coli* se almacenaron en crioviales con BHI y 15% de glicerol a -70°C.

8.5. Identificación de cepas

Las cepas fueron identificadas mediante la definición de su morfología por tinción de gram, fermentación de la lactosa en agar MacConkey y pruebas bioquímicas basados en los criterios de Cowan y Steel (50): T.S.I. (agar de triple azúcar y hierro) (BD Bioxon), L.I.A. (agar hierro lisina) (BD Bioxon), citrato de Simmons (MCD Lab), medio de Christensen (agar urea) (DIBICO) y M.I.O. (movilidad, indol y ornitina) (MCD Lab).

8.6. Extracción de DNA por método de hervido

Las bacterias fueron crecidas en agar tripticaseína de soya (AST) (BD Bioxon®) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se tomó biomasa suficiente y se colocó en microtubos con 500 µl de agua inyectable estéril y se homogeneizó en el agitador vórtex. Se colocaron los tubos en baño María en ebullición durante 15 minutos, se retiró y se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos. Se recuperaron 200 µl del sobrenadante y se colocaron en microtubos estériles. La concentración de ADN fue medida en el espectrofotómetro nanodrop 2000 (ThermoScientific®) y posteriormente se almacenaron a -20°C.

8.7. Amplificación del gen *ybbW*

Se realizó la identificación de *E. coli* mediante la amplificación del gen especie-específico *ybbW* (Walker et al., 2017) (**Tabla 2**) en las concentraciones establecidas en la **Tabla 3**. Se visualizó el amplicón en un gel de agarosa al 1.5% teñido con solución de bromuro de etidio al 0.04% (SIGMA Aldrich®) y se observó la imagen en el fotodocumentador DNR Bio-imagingSystems MiniBIS Pro®.

Tabla 2: Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen <i>ybbW</i>				
Reacción de PCR	Primers (5'-3')	Codifica	Tamaño (pb)	Referencias
<i>ybbW</i>	F: TGATTGGCAAATCTGGCCG	Transportador de alantoína	667 pb	(Walker <i>et al.</i> , 2017)
	R: ATACTGGCAATCAGTACGCC			(Carreón-León, 2019)
Condiciones	94°Cx4 min; 1 ciclo 94°Cx30 seg; 63°Cx30 seg; 72°Cx45 seg; 35 ciclos 72°Cx5 min; 1 ciclo			

Tabla 3: Componentes para la amplificación del gen <i>ybbW</i>			
Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Agua	---	6.4 ml	---
Buffer 10X	10 X	1 ml	1 X
MgCl ₂	25 Mm	1 ml	2.5 Mm
dNTP's (dNTP Set, thermoscientific)	10 mM	0.4 ml	0.4 mM
Iniciador delantero (SIGMA)	25 mM	0.3 ml	0.75 mM
Iniciador reverso (SIGMA)	25 mM	0.3 ml	0.75 mM
Taq polimerasa DNA (DreamTaq polymerase, thermoscientific)	5 U/ml	0.1 ml	0.5 U/ml
DNA	100 ng/ml	0.5 ml	5 ng
Total	---	10 ml	---

8.8. Evaluación del perfil fenotípico de susceptibilidad antimicrobiana y producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Se recuperaron de 2 a 4 colonias y se resuspendieron en un tubo de ensayo con 3 ml de solución salina isotónica (0.85% de NaCl) que se igualaron al tubo 0.5 en la escala de turbidez McFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml. Después de resuspender las colonias se procedió a impregnar un hisopo estéril de la muestra, y se inocularon placas de agar Müller Hinton. Posteriormente se colocaron los sensidiscos de los antibióticos descritos en la **Tabla 4** con ayuda de pinzas previamente esterilizadas. Finalmente, las placas se incubaron de 16 a 18 horas a 37°C y los resultados se interpretaron de acuerdo con el CLSI M100TM Ed. 34, 2024.

8.9. Determinación fenotípica de BLEE

Para la prueba de susceptibilidad de difusión de doble disco propuesto por la EUCAST se usaron los sensidiscos amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP) y aztreonam (ATM) con las concentraciones descritas en la **Tabla 4**. El sensidisco de AMC fue colocado en medio de la placa, mientras que los otros sensidiscos fueron distribuidos a 25 mm de manera equidistante como lo indicado en la **Figura 2**. La prueba se interpretó como positiva si entre los sensidiscos ATM, CTX, CAZ, FEP y el AMC se observó una distribución mayor del halo de inhibición en forma de ojo de cerradura o cola de pez.

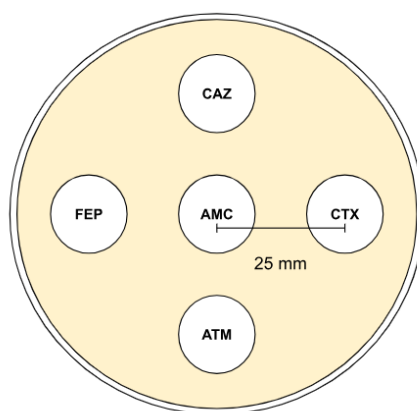


Figura 2: Disposición de los sensidiscos de amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM) y cefotaxima (CTX) para identificación del fenotipo BLEE (Carreón-León, 2019).

8.10. Búsqueda de genes que codifican BLEE

Se amplificaron los genes de las serín β -lactamasas más representativas del subgrupo 2b (*bla*_{TEM}), 2be (*bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) y 2d (*bla*_{OXA}) bajo las especificaciones mencionadas en la **Tabla 5**. Se visualizó el amplicón en un gel de agarosa al 1.5% teñido con solución de bromuro de etidio al 0.04% (SIGMA Aldrich®) y se observó la imagen en el fotodocumentador DNR Bio-imagingSystems MiniBIS Pro®.

8.11. Diseño estadístico

8.11.1. Análisis de datos

Toda la información recolectada y la obtenida durante las pruebas realizadas en el laboratorio fue concentrada en una tabla creada en Excel de Microsoft365. Se realizó un análisis estadístico descriptivo del número de unidades formadoras de colonias (UFC/g) por gramo de cada muestra mediante la prueba ANOVA de una vía en R Studio v4.4.1 para comparar la tasa de contaminación de las muestras de cada tipo de establecimiento usando una base de datos creada en Excel de Microsoft365.

8.11.2. Hipótesis estadística

Hay una diferencia significativa entre las tasas de contaminación por bacterias resistentes a β -lactámicos según el origen de las muestras de cilantro.

Tabla 4: Antibióticos usados y puntos de corte

Grupo/ Familia	Antibiótico	Contenido (µg)	Abreviación	Categorías interpretativas y puntos de corte de diámetro de zona, mm entero más cercano			
				S	SSD	I	R
Penicilinas	Ampicilina	10	AM	≥17	-	14-16	≤13
Penicilinas con inhibidor	Amoxicilina/ ác. clavulánico	20/10	AMC	≥18	-	14-17	≤13
Cefemes parenteral (Cefalosporinas I, II, III y IV)	Cefoxitina	30	FOX	≥18	-	15-17	≤14
	Cefuroxima	30	CXM	≥18	-	15-17	≤14
	Cefotaxima o ceftriaxona	30	CTX CRO	≥26 ≥23	-	23-25 20-22	≤22 ≤19
	Ceftazidima	30	CAZ	≥21	-	18-20	≤17
	Cefepime	30	FEP	≥25	19-24	-	≤18
Monobactámicos	Aztreonam	30	ATM	≥21	-	18-20	≤17
Carbapenémicos	Imipenem	10	IMP	≥23	-	20-22	≤19
	Meropenem	10	MEM	≥23	-	20-22	≤19
Lipopéptidos	Colistina o polimixina	MIC	CL PB	-	-	≤2	≥4
Aminoglucósidos	Gentamicina	10	GM	≥18	-	15-17	≤14
	Tobramicina	10	NN	≥17	-	13-16	≤12
	Amikacina	30	AN	≥20	-	17-19	≤16
	Estreptomina	10	S	≥15	-	12-14	≤11

Tetraciclinas	Tetraciclina	30	TET	≥15	-	12-14	≤11
Quinolonas y fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	5	CIP	≥26	-	22-25	≤21
	Levofloxacina	5	LVX	≥21	-	17-20	≤16
	Ácido nalidixico	30	NA	≥19	-	14-18	≤13
Fenicoles	Cloranfenicol	30	C	≥18	-	13-17	≤12
Antagonistas de la vía de folatos	Trimetoprim/ sulfametoxazol	1.25/23.75	SXT	≥16	-	11-15	≤10
Fosfomicinas	Fosfomicina	200	FOS	≥16	-	13-15	≤12

Información obtenida de CLSI M100TM Ed. 34, 2024.

Tabla 5: Oligonucleótidos para identificación de serín β-lactamasas de espectro extendido

Nombre de los iniciadores		Tm (°C)	Secuencia	Tamaño del amplicón	Condiciones	Cepa control positivo	Referencia
bla _{OXA}	Oxa1-F	53.2	CCA AAG ACG TGG ATG	442 pb	96°C->5min->1c 96°C->1min 61°C->1m->35c 72°C->2min 72°C->10m->1c	A23EC (Balbuena-Alonso <i>et al.</i> , 2023)	(Briñas <i>et al.</i> , 2003)
	Oxa2-R	59.3	GTT AAA TTC GAC CCC AAG TT				
bla _{SHV}	SHV1-F	64.98	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GCT	930 pb	96°C->15s->1c 96°C->15seg 61°C->15s->24c 72°C->2min	ATCC700603 (Acevedo-Ocampo, 2023)	(Mercier & Levesque, 1990)
	SHV2-R	69.06	TAG CGT TGC CAG TGC TCG				

					72°C->3min-> 1c		
<i>bla</i> _{TEM}	TEM1F	61.07	AGA GTA TGA GTA TTC AAC ATT	837 pb	94°C-> 5min-> 1c 94°C-> 1min 50°C-> 1min-> 35c 72°C-> 1min 72°C-> 5min-> 1c	C-3304 (Babines-Orozco, 2024, datos no publicados)	(Lee <i>et al.</i> , 2001)
	TEM2R	59.3	ATC TCA GCG ATC TGT CTAT				
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M Uni F	57.1	CGA TGT GCA GTA CCA GTAA	566 pb	94°C-> 5min-> 1c 94°C-> 30seg 52°C->30seg-> 35c 72°C-> 1min 72°C-> 5min-> 1c	A23EC (Balbuena-Alonso <i>et al.</i> , 2023)	(Batchelor <i>et al.</i> , 2005)
	CTX-M Uni R	62.8	TTA GTG ACC AGAATC AGC GG				
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTXM-2F	52.2	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG	876 pb	94°C -> 5 min -> 1c 94°C->30seg 52°C->30seg-> 35c 72°C->1min 72°C -> 5min ->1c	C7210 (Cortés-Cortés <i>et al.</i> , 2016)	(Bertrand <i>et al.</i> , 2006)
	CTXM-2R	51.9	TCA GAA ACC GTG GGT TAC				
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-M8-F	52.4	TGA TGA GAC ATC GCG TTAAG	866 pb	94°C -> 5 min -> 1c 94°C->30seg 52°C->30seg->35c 72°C->1min 72°C 5 min 1 c	-	(Hopkins <i>et al.</i> , 2006)
	CTX-M8-R	54.3	TAA CCG TCG GTG ACG ATT TT				

<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-M9-F	64.8	GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG	857 pb	94°C->3 min->1c 94°C->45seg 62°C->45seg->35c 72°C->45seg 72°C->10 min->1c	-	(Coque <i>et al.</i> , 2002)
	CTX-M9-R	71.6	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC				
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	CTXM3 G-F	57.4	GTT ACA ATG TGT GAG AAG CAG	1018 pb	94°C-> 7min-> 1c 94°C-> 50seg 50°C->40seg-> 35c 68°C-> 1min 68°C-> 1min-> 1c	A23EC (Balbuena-Alonso <i>et al.</i> , 2023)	(Pagani <i>et al.</i> , 2003)
	CTXM3 G-R	60.9	CCG TTT CCG CTA TTA CAAAC				

9. Resultados

9.1. Recolección de muestras de cilantro

Un total de 80 muestras de cilantro de distintos orígenes se procesaron durante el periodo agosto-diciembre de 2023 en el municipio de H. Puebla de Zaragoza (mapa de las localizaciones de los puntos de muestreo en el **Anexo 1**: verdulerías (n=26), restaurantes (n=18), mercados (n=18), supermercados (n=14) y sin origen especificado (n=4).

9.2. Determinación de la tasa de contaminación

A partir de cada origen de cilantro (verdulería, mercado, supermercado, restaurante y origen inespecífico) se realizó una prueba de ANOVA ($p>0.05$) con lo que se concluyó que no hubo diferencias significativas entre las tasas de contaminación de los distintos orígenes. Además, se reportó un promedio de 6.38 log UFC/g, siendo la muestra 66 sin origen específico la más contaminada con 8.58 log UFC/g, seguida de la muestra 50 con 8.28 log UFC/g recolectada de verdulería. Por otra parte, las muestras con menor carga bacteriana fueron la muestra 8 (verdulería), 63 (supermercado), 64 (origen no especificado) y 69 (supermercado) con 4 log UFC/g, respectivamente (**Figura 3**).

9.3. Distribución de la microbiota gram negativa y positiva

Se obtuvieron un total de 162 (100%) aislados bacterianos, de los cuales, 32 se identificaron como grampositivas (19.75%) y los 130 restantes fueron gramnegativos (80.25%). La distribución de las cepas grampositivas en restaurantes, mercados, supermercados, verdulerías y sin origen específico fue 3.08%, 6.17%, 0.59%, 7.4% y 2.38% respectivamente; mientras, que la distribución de gramnegativos fue: restaurantes con 22.83%, mercados con 14.81%, supermercados con 16.04%, verdulerías con 25.3% y sin origen específico con 1.23%.

9.4. Aislamiento e identificación de *E. coli*

De acuerdo con los resultados a partir del crecimiento en agar MacConkey (lactosa positiva) y de la observación microscópica de la tinción de gram (gramnegativo y forma bacilar) se sometieron 68 cepas a pruebas bioquímicas distintivas de *E. coli*

(T.S.I., L.I.A., Citrato de Simmons, Urea de Christensen y Movilidad, Indol, Ornitina) (**Anexo 2**). Mediante estas pruebas, se identificaron 13 cepas de *E. coli* (19%) y los aislados restantes pertenecieron a los géneros *Klebsiella* (n=38), *Citrobacter* (n=3), *Proteus* (n=2), *Pantoea* (n=2) y *Providencia* (n=1) (**Figura 4**). Los aislados de *E. coli* se confirmaron molecularmente a través de la amplificación del gen *ybbW* (**Anexo 3**).

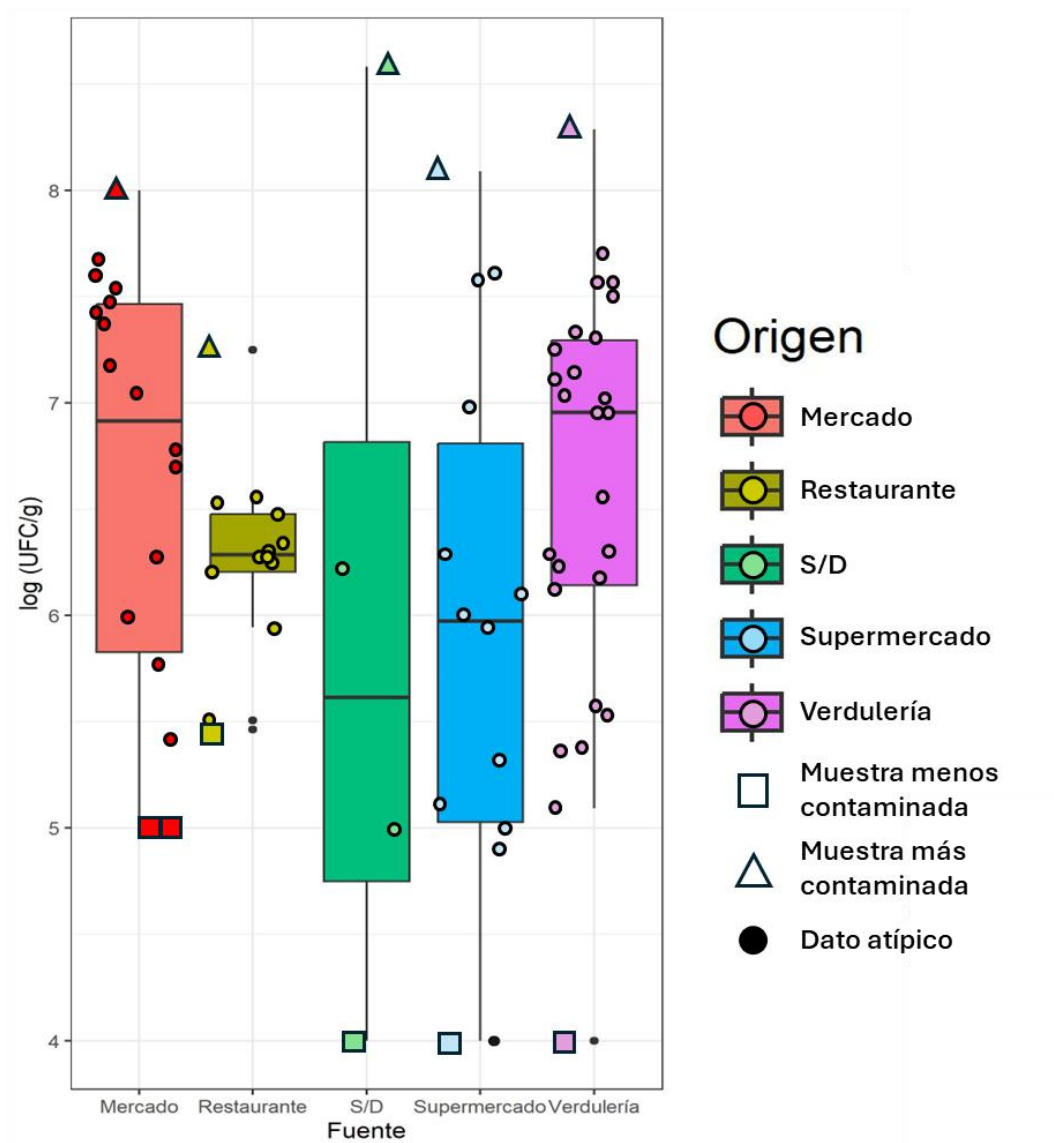


Figura 3: Diagrama de caja y brazos de las tasas de contaminación por origen de las muestras de cilantro. S/D: Sin datos de origen. Cada punto, triángulo y cuadro representa una muestra.

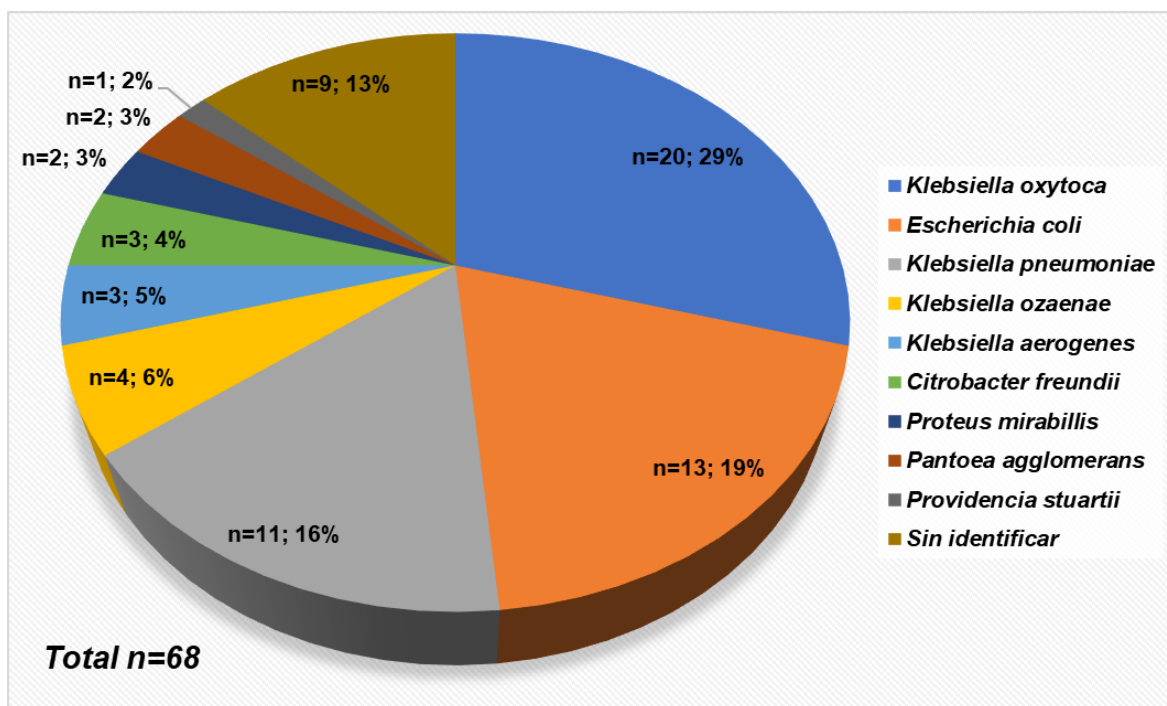


Figura 4: Porcentaje de abundancia de las especies bacterianas gram negativas encontradas en cilantro. (n=): número de cepas aisladas. Sin identificar: indica que los datos no fueron concluyentes en la identificación bioquímica.

9.5. Perfil de susceptibilidad y producción del fenotipo BLEE

La susceptibilidad de las 13 cepas de *E. coli* fueron evaluadas según lo mencionado en la **Tabla 4**. Se encontró que las 13 cepas fueron MDR según los criterios de Magiorakos (Magiorakos *et al.*, 2012), además de que todas presentaron el fenotipo BLEE (**Figura 5**) y exhibieron resistencia a los β -lactámicos ampicilina y a las oximinocefalosporinas cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona (**Tabla 6**). También hubo presencia de colonias satélite, es decir, UFC que crecen en el halo de inhibición, en 12 de las 13 cepas ante la presencia de antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y fosfomicinas (**Tabla 6**).

Antibiótico		CEPAS DE <i>E. coli</i> (ORDENADAS POR ORIGEN)												
		Verdulería						Mercado					Supermercado	Restaurante
		13C-1	14C-1	53C-1	68C-2	78C-1	80C-1	32C-1	34C-2	44C-2	46C-2	48C-2	20C-1	5C-1
Penicilinas	AM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Penicilina con inhibidor	AMC	S	S	R ^S	S	S	I	I	R	I	S	I	S	S
Cefalosporinas (I, II, III y IV)	FOX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	CXM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	CTX	R ^S	R ^S	R	R	R ^S	R ^S	R ^S	R ^S	R ^S	R ^S	R ^S	R ^S	R
	CRO	R ^S	R ^S	R	R	R ^S	R	R ^S	R ^S	R ^S	R ^S	R ^S	R ^S	R
	CAZ	I	S	S	S	R	R	R	R	S	R ^S	R ^S	I	S
	FEP	R	I	I	S	R ^S	R ^S	R	R	R	R	R	R	I
Monobactámicos	ATM	R	R	S	S	R	R ^S	R	R	R	R ^S	R	R	S
Carbapenémicos	IMP	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	MEM	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Aminoglucósidos	GM	S	R	S	S	I	R	S	S	R ^S	I	I	R	S
	NN	S	I ^S	S	S	I	R ^S	I	S	R	I ^S	I	I ^S	S
	AN	I	I	S	I	S	S	S	I	S	S	S	R	S
	STS	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R ^S	R	R	R
Tetraciclinas	TET	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
Quinolonas y fluoroquinolonas	CIP	R	I	I	S	R	S	R	R	R	R	R	S	I
	LVX	I	I	I	S	R	S	R	I	S	I	I	S	S
	NA	S	R	S	S	R	I	R	I	I	I ^S	R ^S	S	S
Fenicoles	C	S	S	S	S	R	R	R	S	I	S	R	S	S
Antagonista de la vía de folatos	SXT	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
Fosfomicinas	FOS	S	R	S ^S	S ^S	R	S ^S	R	S ^S	S ^S	S ^S	I ^S	R	S
Presencia de sinergismo con AMC (Fenotipo BLEE)		Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Tabla 6: Perfil de susceptibilidad y presencia del fenotipo BLEE de las cepas de *E. coli* aisladas de cilantro fresco. S: sensible; I: intermedio; R: resistente; S^S: sensible con presencia de colonias satélite; I^S: resistencia intermedia con presencia de colonias satélite; R^S: resistente con presencia de colonias satélite. AM: ampicilina; AMC: amoxicilina con ácido clavulánico; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; IMP: imipenem; MEM: meropenem; GM: gentamicina; NN: tobramicina; AN: amikacina; STS: estreptomicina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; LVX: levofloxacino; NA: ácido nalidíxico; C: cloranfenicol; SXT: trimetoprima sulfametoxazol; FOS: fosfomicina.



Figura 5: Placa representativa del sinergismo con AMC característico del fenotipo BLEE en la cepa 32C-1

En general, las cepas mostraron mayor resistencia a la familia de los β -lactámicos (100%), seguidos de los aminoglucósidos (84.6%), y tetraciclinas (76.9%). De manera particular se observó una alta resistencia a cefalosporinas de tercera generación, las cepas presentaron un 100% de resistencia a cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona, 46% fueron resistentes a ceftazidima, 69% a cefepime, 76% a aztreonam; sin embargo, ningún aislado fue francamente resistente a carbapenémicos, aunque la cepa 53C-1 proveniente de verdulería resultó tener resistencia intermedia a imipenem y meropenem. En cuanto a la resistencia a colistina, se realizó la prueba comparativa de difusión en disco respecto a la cepa ATCC25922, este método aún no está validado por los estándares del M100 CLSI 2024; sin embargo, puede servir como indicador, y bajo este criterio se determinó la posible resistencia a colistina de 12 cepas (92%). En cuanto al resto de familias de antibióticos, los aislados de *E. coli* presentaron un alto porcentaje de resistencia a estreptomicina (84%), tetraciclina (76%), ciprofloxacino (54%) y trimetoprima sulfametoxazol (61%) (**Figura 6**). Se determinó no realizar una comparativa en cuestión al porcentaje de susceptibilidad por origen debido a la disparidad en la cantidad de cepas de *E. coli* recolectadas de los distintos establecimientos.

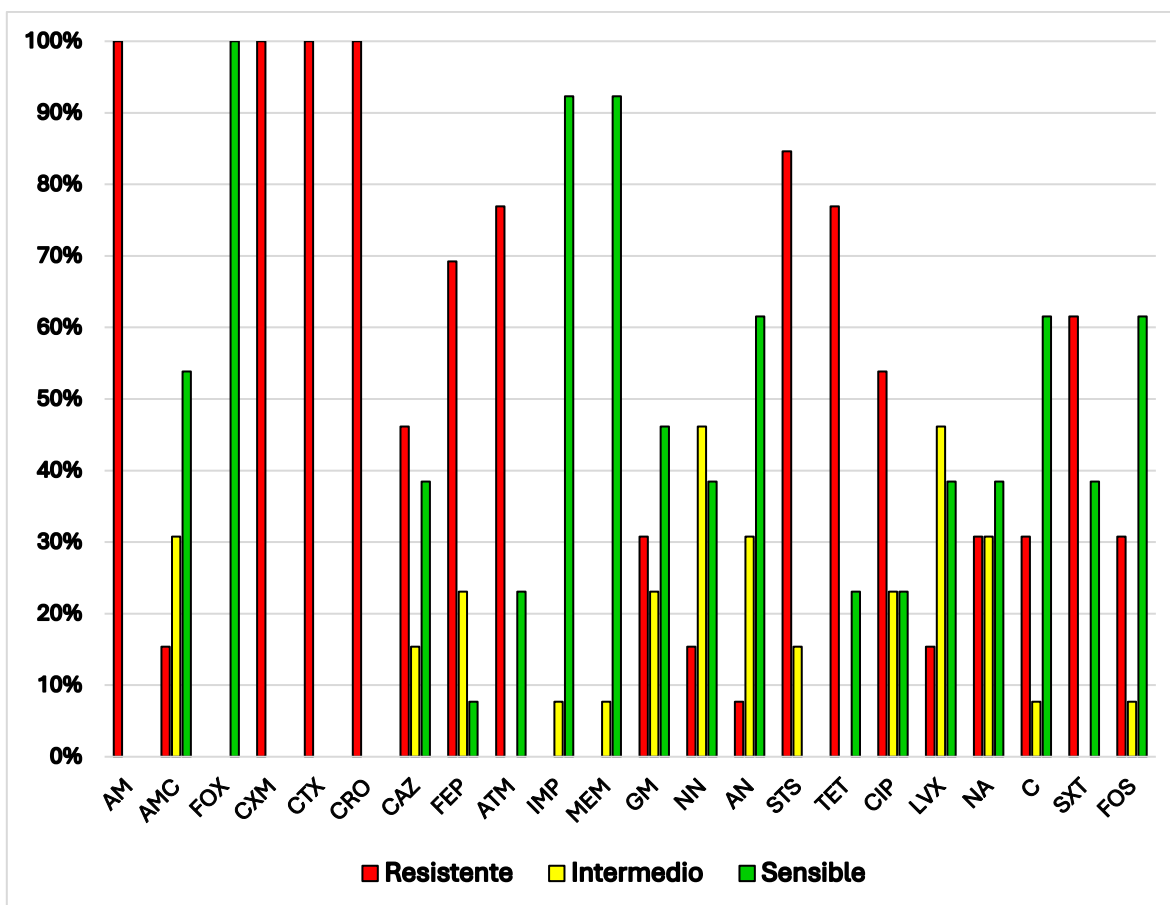


Figura 6: Porcentaje de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* aisladas de cilantro fresco. AM: ampicilina; AMC: amoxicilina con ácido clavulánico; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; IMP: imipenem; MEM: meropenem; GM: gentamicina; NN: tobramicina; AN: amikacina; STS: estreptomicina; TET: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; LVX: levofloxacino; NA: ácido nalidíxico; C: cloranfenicol; SXT: trimetoprima sulfametoxazol; FOS: fosfomicina.

9.6. Identificación de genes que codifican para serín β -lactamasas (BLEE)

Debido a que todas las cepas mostraron presencia del fenotipo BLEE, se determinó la ausencia o presencia de los genes vinculados con la producción de BLEE de la clase molecular A más comunes (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} y *bla*_{SHV}) mediante PCR. De las 13 cepas, el 92.3% (12/13) mostraron presencia del gen *bla*_{CTX-M} (**Figura 7A**), de las cuales 10 cepas mostraron la variante *bla*_{CTX-M-15} (**Figura 7B**); las dos cepas restantes (32C-1 y 48C-2) no pudieron asignarse a ninguna otra variante de las enzimas CTX-M del grupo 2, grupo 8 o grupo 9 mediante PCR (**Anexo 4**).

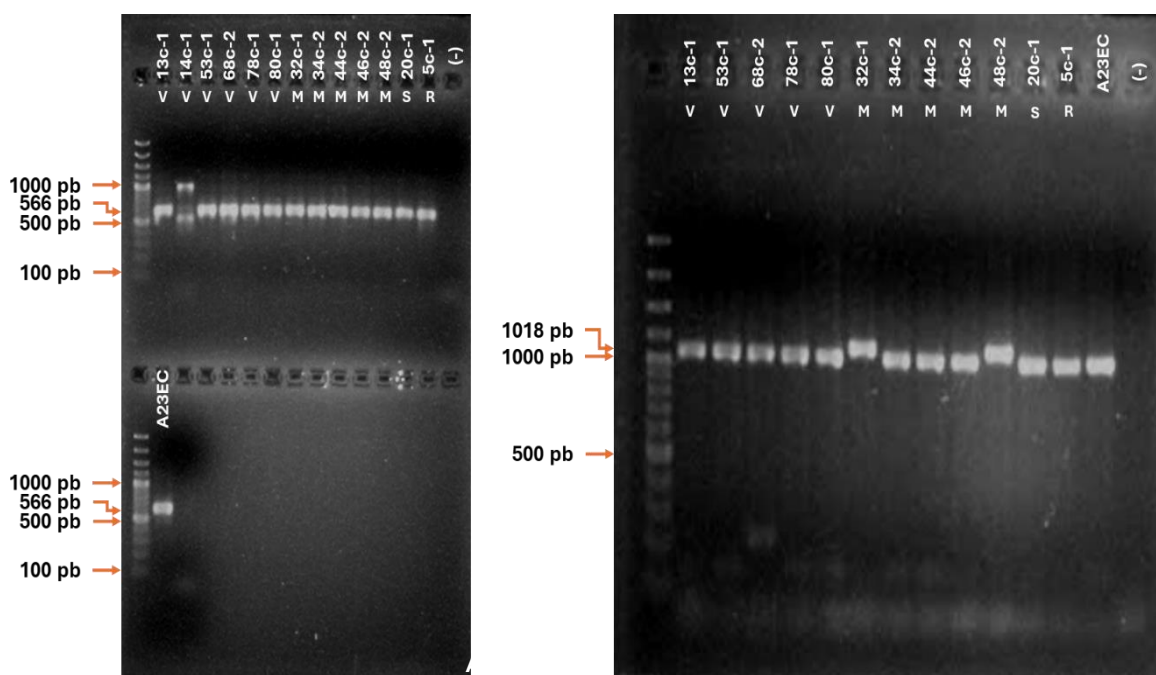


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra la presencia del gen *bla*_{CTX-M} (566 pb) en el panel A y *bla*_{CTX-M-15} (1018 pb) en el panel B. El control positivo en ambos paneles es la cepa *E. coli* A23EC. V: verdulería; M: mercado; S: supermercado; R: restaurante; pb: pares de bases.

En cuanto a la identificación *bla*_{TEM}, el 54% (7/13) mostró la presencia de este gen (Figura 8A), de las cuales, cuatro fueron de verdulería y tres fueron de mercado. Este gen es el segundo con mayor presencia entre las cepas aisladas. Por su parte, *bla*_{OXA} solo estuvo presente en el 7.7% (1/13) proveniente de mercado (Figura 8B) en cambio, *bla*_{SHV} estuvo ausente en todas las cepas (Anexo 5).

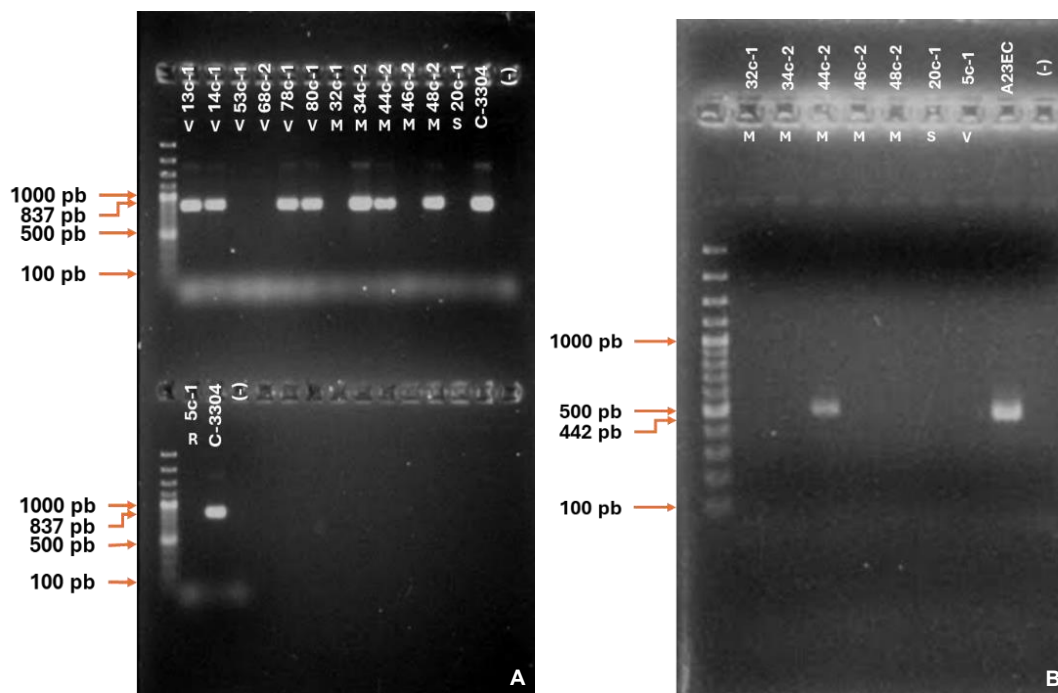


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra la presencia del gen *bla*_{TEM} (837 pb) en el panel A y *bla*_{OXA} (442 pb) en el panel B. El control positivo en el panel A la cepa *E. coli* C3304, mientras que en el panel B es *E. coli* A23EC. V: verdulería; M: mercado; S: supermercado; R: restaurante; pb: pares de bases.

10. Discusión

Las ETAs son causantes de más de 600 millones de casos a nivel mundial y más de 400 mil muertes anuales (Heredia & Garcia, 2018). Uno de los principales microorganismos asociados a ETAs es *E. coli*, una bacteria de distribución mundial que pertenece a la microbiota del intestino de animales de sangre caliente. Debido a ello, su presencia se considera como un indicador de contaminación fecal reciente en agua y un indicador de malas prácticas de higiene en la cadena de suministro (Jang *et al.*, 2017).

En México hay múltiples zonas que han sufrido sequías provocadas por el cambio climático, el crecimiento de la población, falta de agua potable y de infraestructura que provea de este recurso, esto ha motivado que algunos productores usen aguas de desecho para riego de cultivos considerada apta para este fin de acuerdo con límites fisicoquímicos y bacteriológicos (Estrada & Rojas, 2016). En este sentido se considera que lo anterior podría ser una de las razones por las cuales en otros países como Estados Unidos se hayan encontrado productos como frutas o verduras provenientes de México contaminados no solo con agentes químicos como pesticidas, sino con microorganismos patógenos provenientes de heces como *Salmonella* spp. o *Cyclospora cayetanensis* (FDA, 2022; FDA, 2023). Este hallazgo ha motivado a que agencias sanitarias pidan pruebas de ausencia de microorganismos indicadores de contaminación como *E. coli* a las empacadoras (FDA, 2022). A pesar de que *E. coli* se considera una bacteria generalmente inocua, su capacidad de dar y recibir genes RAM, la aparición de cepas MDR y su supervivencia elevada en múltiples ambientes la vuelven una de las bacterias de mayor preocupación a nivel mundial.

A partir de 80 muestras de cilantro fresco provenientes de verdulerías, restaurantes, mercados, supermercados y de origen inespecífico se determinó que el cilantro en promedio albergaba 6.38 log UFC/g de bacterias potencialmente resistentes a β -lactámicos, un valor superior a lo permitido para verduras (100 UFC/g) en la NOM-093-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1995), esto es similar a lo reportado por Pintor-Cora en España durante el 2021, pues cuantifica una tasa de contaminación en el cilantro de 5.1 ± 0.8 log UFC/g (Pintor-Cora *et al.*, 2021); sin embargo, se debe

considerar que no se usó un filtro con CTX en el estudio realizado por Pintor-Cora. Por el contrario, Rodríguez-López y su equipo, en 2022, mediante el uso de agar MacConkey adicionado con CTX, reportaron una tasa de contaminación promedio de 2.57 log UFC/g en muestras de cilantro sin tratamiento previo (Rodríguez-López et al., 2022) siendo este resultado aproximadamente dos veces menor a lo que se reporta en el presente estudio. A pesar de las diferencias en las metodologías usadas, los datos sugieren que la tasa de contaminación de cilantro es alta, esto puede deberse a varias situaciones, desde los métodos de higiene usados, manipulación del producto, época del año en el que se cultivó el cilantro, inclusive el país. Sin embargo, aunque se hayan usado técnicas metodológicas distintas, la tasa de contaminación reportada en este estudio sigue siendo preocupantemente mayor que lo mencionado en otras investigaciones.

Este resultado conlleva a una preocupación adicional, ya que las bacterias cuantificadas son potencialmente resistentes a los β -lactámicos, esto no solo se ha reportado en cilantro, sino en una amplia variedad de vegetales de hoja verde, lo que representa un riesgo microbiológico alto, puesto que no solo podrían estar presentes bacterias indicadoras de contaminación fecal, sino también bacterias patógenas (OMS, 2016), lo que posiblemente depende también de factores ambientales, riego de los cultivos, prácticas de higiene, entre otros (SENASICA, 2014).

En cuanto a las bacterias encontradas, en este estudio se informó la presencia de varias especies de *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pantoea agglomerans* y *Providencia stuartii*. Esta variedad contrasta con lo encontrado por Pintor-Cora y su equipo en 2021, ya que en su mayoría aislaron *E. coli* seguida de *Serratia fonticola* (Pintor-Cora et al., 2021); sin embargo, varios trabajos reportan la presencia de géneros como *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Serratia* como los principales microorganismos encontrados en suelos, vegetación y agua (Brisse et al., 2006; Iglewski, 1996; Williams, et al., 2022), sería entonces más común encontrar a especies de estos géneros en alimentos frescos sin tratamiento previo. En cambio, la presencia de bacterias como *E. coli*, que

pertenecen a los denominados coliformes fecales, implica que estos alimentos fueron contaminados en alguna parte de la cadena de consumo.

También, en este estudio se destaca la presencia de *E. coli* en el 16.25% de las muestras recolectadas, estos resultados contrastan con lo reportado por Gómez-Aldapa y su equipo de trabajo en Hidalgo durante el 2016, ellos recolectaron 100 muestras de cilantro y determinaron que la prevalencia de *E. coli* en cilantro era de un 47%, teniendo una mayor prevalencia de esta bacteria; sin embargo, en esta metodología no se usa un filtro con CTX (Gómez-Aldapa *et al.*, 2016), lo que pudiera impactar en la cantidad de cepas obtenidas. En cambio, Sung-Suck Oh y colaboradores en 2021, recolectaron en el periodo de septiembre de 2016 a agosto de 2017, 1739 muestras de vegetales comunes de Corea del Sur y determinaron que el rango de contaminación promedio de *E. coli* era de 5.8% (Oh *et al.*, 2021). Por su parte, Tsegahun Asfaw y su equipo en Etiopía durante el 2023, recolectaron 180 muestras de vegetales, de las que se aislaron 46 cepas de *E. coli* con una prevalencia del 26.1% (Asfaw *et al.*, 2023). A partir de estos estudios realizados en varias partes del mundo, se deduce que la prevalencia de *E. coli* puede estar condicionada a la presencia de varios factores como las condiciones ambientales, la manipulación en el proceso de empaque, contaminación cruzada y la forma en que estos son consumidos puesto que se ha reportado que los alimentos crudos listos para el consumo son contaminados frecuentemente por bacterias coliformes (Lee *et al.*, 2021).

Posteriormente, las 13 cepas de *E. coli* fueron caracterizadas como MDR; todos los aislados presentaron resistencia a ampicilina, cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona; además, 10 de las 13 cepas fueron resistentes a aztreonam. Cabe destacar que solo la cefoxitina logró inhibir el crecimiento de todas las cepas; también resalta que, aunque no se hayan presentado cepas resistentes hacia los antibióticos carbapenémicos, una cepa presentó resistencia intermedia, lo cual deberá confirmarse realizando el ensayo de la Concentración Mínima Inhibitoria. Anteriormente, en 2011, Meher Nigad Nipa y colaboradores analizaron 13 cepas de *E. coli* recuperadas de vegetales verdes, entre ellos el cilantro, de los cuales cuatro

fueron MDR, presentando resistencia a ampicilina, estreptomicina y gentamicina (Nipa *et al.*, 2011). Por su parte, Gómez-Aldapa y colaboradores en 2016, informaron que las nueve cepas DEC recuperadas de cilantro presentaban resistencia a amoxicilina con ácido clavulánico, amikacina, colistina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, neomicina y estreptomicina, aunque, todos los aislados fueron susceptibles a ceftriaxona y cloranfenicol (Gómez-Aldapa *et al.*, 2016). Finalmente, Vázquez-Quñones y su equipo en 2024 informaron que la mayoría de sus cepas de ETEC provenientes de cilantro tenían resistencia a cefuroxima (80%) y gentamicina (76.6%), en cambio, sus cepas presentaron baja resistencia a cloranfenicol (13.3%) y amikacina (6.6%) (Vázquez-Quñones *et al.*, 2024).

La aparición continua de cepas MDR en vegetales se puede deber a que ganaderos y agricultores en general llevan a cabo prácticas que propician el uso intensivo, no solo de antibióticos, sino de otros medicamentos que promueven el crecimiento tanto en animales como vegetales. El uso inadecuado puede deberse a la falta de conocimiento, de hecho, estas acciones se le han denominado prácticas multifarmacológicas, y se ha reportado que afecta a los sistemas de acuicultura, agricultura, apicultura y ganadería, que también pueden verse afectados por la contaminación por aguas de desecho (Manyi-Loh *et al.*, 2018). Los aislados de *E. coli* reportados en este estudio presentaron una alta resistencia a cefalosporinas de 3^{ra} generación y a aztreonam, antibióticos usados frecuentemente para tratar enfermedades en humanos; así mismo, la Red PUCRA de la Universidad Nacional Autónoma de México menciona en su reporte que los antibióticos más usados en hospitales públicos en 2022 eran cefalosporinas de 3^{ra} generación, además de haber registrado un mayor número de aislados de *E. coli* en hemocultivos con una mayor resistencia a dichos antibióticos junto al aztreonam (De León Rosales, 2023). Puede existir la posibilidad de que cepas de *E. coli* provenientes de ambientes hospitalarios hayan terminado en aguas de desecho, y que, mediante transferencia horizontal de genes, pudieron intercambiar genes RAM con otras cepas de *E. coli* ambientales, esta situación aunada a la formación de lodos que aumentan la concentración de antibióticos provenientes de la contaminación ambiental permite

que estas cepas ambientales retengan genes RAM y terminen en la cadena de consumo (Patra *et al.*, 2024).

Otro punto importante que mencionar es la alta resistencia que las cepas exhibieron ante estreptomicina, esto pudiera estar relacionado con el hecho de que parte de los antibióticos aminoglucósidos que han sido usados desde varias décadas atrás para el tratamiento contra fitopatógenos como *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp y *Xantomonas* sp en alimentos como manzanas, apios, árboles frutales, chile y tomate. De igual forma, la oxitetraciclina se ha empleado contra *Xantomonas* sp., *Pectobacterium* sp. y *Pseudomonas* sp ya que pueden afectar a diversos alimentos, entre ellos al cilantro (Blanco-Meneses *et al.*, 2023; Guevara & Maselli, 2005). El uso constante de estos antibióticos para el tratamiento de infecciones en los cultivos puede provocar, a la larga, contaminación ambiental y, consecuentemente, provocar la selección de bacterias resistentes.

Por otra parte, 7 de las 13 cepas presentaron resistencia a ciprofloxacino, miembro de las fluoroquinolonas, las cuales, se han usado recientemente como promotores del crecimiento de la raíz en maíz (Gomes *et al.*, 2019). Otro dato importante fue que el 61% de los aislados de *E. coli* fueron resistentes a trimetoprima sulfametoxazol, el sulfametoxazol en particular pertenece a la familia de las sulfonamidas que se ha reportado su uso como promotores del crecimiento en animales, además de haberse identificado en bajas cantidades en aguas superficiales contaminadas por desechos hospitalarios en países como Vietnam (Prasannamedha & Kumar, 2020).

Por otra parte, en este estudio se informó la presencia de cuatro cepas resistentes a fosfomicina. Freitag y colaboradores en 2018 también recuperaron aislados de *E. coli* en brotes de soya, los cuales presentaron genes de resistencia a fosfomicina (Freitag *et al.*, 2018); es interesante este hallazgo ya que el uso de este antibiótico en particular es recomendado únicamente en la clínica humana para el tratamiento de infecciones del tracto urinario complicadas, teniendo un rango de efectividad igual a antibióticos carbapenémicos (Tutone *et al.*, 2022). El ser un antibiótico usado por más de 30 años, pudiera explicar porque han aparecido cada vez con mayor

frecuencia cepas resistentes a esta clase de antibióticos. Por último, el caso de la colistina es especial, puesto que se usa como antibiótico de último recurso pues resulta ser neuro y nefrotóxico, el cual se usa para tratar infecciones graves causadas por bacterias gramnegativas, sin embargo, en el ámbito veterinario se ha usado como promotor del crecimiento y para tratar infecciones comunes (Osores, 2020). Esta situación ha provocado la aparición de cepas de *E. coli* resistente a este antibiótico en productos cárnicos y vegetales (Chelaghma *et al.*, 2021).

Los datos reportados en los casos descritos sugieren que la aparición de cepas resistentes a la actividad de aminoglucósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, fosfomicinas y polimixinas se debe a varios factores, principalmente el uso inadecuado de antibióticos ya sea como promotores del crecimiento en animales o vegetales, contaminación de cuerpos de agua con desechos provenientes de hospitales, heces de animales o productos químicos que contengan compuestos derivados de antibióticos, entre otros, los cuáles podrían provocar que microorganismos ambientales como *E. coli*, *Pseudomonas* sp. o *Klebsiella* sp. resistentes a antimicrobianos sean seleccionados y se diseminen en la cadena de suministro, o en cambio, se podría sugerir que cepas resistentes a antibióticos provenientes de ambientes hospitalarios terminen en los campos de cultivo y diseminen genes RAM a la microbiota de los vegetales y de igual forma, terminar en la cadena de suministro debido a las malas prácticas de higiene (Kumar *et al.*, 2020).

Uno de los resultados interesantes en pruebas de susceptibilidad fue la aparición de colonias satélites dentro de los halos de inhibición en varios antibióticos. Este fenómeno se ha denominado como heteroresistencia, la cual es generada por una sola cepa que se divide en subpoblaciones con mecanismos de resistencia a antimicrobianos distintos que pueden surgir de manera espontánea. Estos eventos han sido reportados desde principios del 2000 y se han identificado en múltiples países de Europa, Norteamérica, Sudamérica y Asia en aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* sp., *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*

principalmente resistentes a colistina, polimixina B, imipenem y meropenem (Andersson *et al.*, 2019) hasta la fecha se carece de información suficiente acerca de esta resistencia fenotípica, aunque cabe aclarar que la importancia del estudio de la heteroresistencia reside en que, si la subpoblación heteroresistente sobrevive a un tratamiento antibiótico, puede lograr expandir el tiempo de infección en personas enfermas y provocar que la antibioticoterapia fracase (Band & Weiss, 2021). Hasta donde se sabe, este es uno de los primeros reportes que muestra este fenómeno en aislados provenientes de alimentos; sin embargo, debido al alcance de este trabajo, se propone realizar posteriormente una caracterización completa de cada subpoblación dentro del halo.

Finalmente, se mostró que todos los aislados presentaron fenotipo BLEE, sugiriendo la presencia de genes *bla*. Debido a ello se procedió a buscar los genes de las β -lactamasas más comunes en enterobacterias en los 13 aislados; identificando que 10 fueron positivos para la presencia de *bla*_{CTX-M-15}, siete presentaron *bla*_{TEM} y una cepa exhibió *bla*_{OXA}.

Un estudio similar en México fue llevado a cabo por Vázquez-López y su equipo en 2018, ellos recolectaron cinco bolsas de ensaladas listas para el consumo, de las cuales aislaron 12 cepas, 10 de las cuales presentaron *bla*_{SHV}, y 9 exhibían variantes del gen *bla*_{CTX-M} (Vázquez-López *et al.*, 2018). Mientras que Ghimire y colaboradores en 2020 reportaron la presencia de una cepa de *E. coli* portadora de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} (Ghimire *et al.*, 2020). Por su parte, Hadas-Kon y su equipo en 2023 recolectaron más de 300 muestras de vegetales frescos listos para el consumo, en su estudio, ellos detectaron la presencia de cuatro cepas de *E. coli* que poseían variantes de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, y *bla*_{CTX-M}, este último gen fue el predominante en todos los aislados de enterobacterias que ellos reportaron (Kon *et al.*, 2023).

Recientemente, Silvan-Tresch y su equipo en 2024 recolectaron muestras de vegetales frescos en Suiza, identificaron seis cepas de *E. coli* productoras de BLEE las cuales poseían el gen *bla*_{CTX-M-15} (Tresch *et al.*, 2024). La presencia de estos genes de resistencia concuerda con la epidemiología reportada por Mariana-

Castanheira y colaboradores en 2021, pues reportan un incremento de la diseminación de enterobacterias productoras de CTX-M en todo el mundo. México en particular presenta un alto porcentaje de presencia de enterobacterias aisladas productoras de CTX-M del grupo 1, 2 y en menor medida, SHV (Castanheira *et al.*, 2021), este dato concuerda con los resultados de este estudio pues se aislaron un mayor número de cepas que poseían genes *bla*_{CTX-M-15}, además de que, con base a los reportes y a los resultados de este trabajo, la tendencia de SHV en enterobacterias va a la baja. A su vez, el reporte de Castanheira menciona que TEM es una de las BLEE que menos se reporta en México y Latinoamérica, lo cual hace un contraste con lo reportado en el presente trabajo, pues se encontró en más del 50% de las cepas.

Estos resultados implican varios puntos, el primero es que CTX-M-15, una de las variantes de mayor distribución a nivel mundial del subgrupo 1 (Husna *et al.*, 2023), puede estar desplazando a las otras BLEE debido a la presencia de cefalosporinas de 3^{ra} generación en el ambiente. Mientras que el caso de TEM, la cual a pesar de mostrar una baja prevalencia y tener una mayor presencia en Estados Unidos y países europeos (Castanheira *et al.*, 2021; Michael *et al.*, 2015), puede proveer resistencia ante ampicilina y ticarciclina, mientras que en el caso de OXA puede conferir resistencia no solo a ampicilina, sino también a la amoxicilina con ácido clavulánico y a algunas cefalosporinas de 4^{ta} generación (Navarro *et al.*, 2011).

Se sugiere entonces que la presencia de cepas de *E. coli* productoras de múltiples BLEE son un riesgo microbiológico al tener la capacidad de diseminar genes que expresen estas BLEE y otros genes RAM que propaguen la resistencia a otras cepas presentes en los vegetales, o, por otro lado, que las cepas de *E. coli* MDR reportadas en este estudio sean un peligro microbiológico al pertenecer posiblemente a alguno de los patotipos DEC o ExPEC y , tal vez, provocar enfermedades infecciosas de difícil tratamiento.

En conclusión, la situación de contaminación del medio ambiente por antibióticos puede provocar la aparición de cepas MDR que puedan provocar un efecto domino, esparcir genes RAM a otras bacterias y causar ETAs u otras enfermedades que

sean difíciles de tratar. A pesar de que este trabajo se haya enfocado únicamente en un alimento específico, otros estudios han determinado la presencia de *E. coli* patógena en diversos productos tanto de origen animal como vegetal, entonces, para asegurar la inocuidad de los productos se requiere un mejor servicio de distribución de agua, informar a los agricultores y manipuladores de alimentos de los riesgos que conllevan los alimentos contaminados e implementar un sistema de capacitación enfocado en la enseñanzas de las normas oficiales mexicanas enfocada a alimentos, puesto que, a pesar de que haya leyes mexicanas vigentes como la NOM-113-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1995) la cuál ayuda a determinar la densidad microbiana y la presencia de bacterias coliformes como *E. coli* o la NOM-093-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1995) que señala las disposiciones sanitarias a cumplir en cuestión a la preparación de los alimentos para la protección del consumidor, algún elemento dentro de la cadena de consumo, ya sea humano o ambiental, termina contaminando el vegetal. terminan siendo ineficientes.

11. Conclusiones

- El cilantro poblano puede actuar como reservorio de bacterias resistentes a más de una familia de antibióticos, especialmente a los β -lactámicos.
- La tasa de contaminación según el origen de las muestras no presentó una diferencia significativa, estos datos sugieren que las medidas de higiene implementadas en las cadenas de consumo y distribución no son efectivas.
- La detección de *E. coli* MDR indica contaminación fecal y la exposición a múltiples clases de antibióticos a lo largo de la cadena de suministro y en el medio ambiente.
- Todas las cepas de *E. coli* recuperadas exhibieron, aunque sea un gen asociado a la producción de BLEE, mientras que el 92% de los aislados exhibieron alguna variante de la familia de las cefotaximasas.
- El gen *bla*_{CTX-M-15} fue el gen asociado a la producción de BLEE más abundante en el estudio, seguido por *bla*_{TEM} y por último *bla*_{OXA}, lo que confirma la amplia distribución de CTX-M y el desplazamiento de los otros genes asociados a la producción de BLEEs.

12. Perspectivas

- Corroborar el género y especie de los 149 aislados restantes recuperados en este estudio.
- Realizar la concentración mínima inhibitoria de colistina para confirmar la resistencia de las cepas de *E. coli* frente a este antibiótico.
- Determinar el filogrupo, serotipo, secuenciotipo y patotipo de las cepas de *E. coli* reportadas en este trabajo.
- Identificar genes RAM en las otras familias de antibióticos mediante PCR.
- Realizar la búsqueda de posibles elementos genéticos móviles asociados a los genes identificados de las betalactamasas.
- Determinar la filogenia de las cepas de *E. coli* aisladas de cilantro mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados.
- Analizar y caracterizar las colonias satélites que crecieron dentro de los halos de inhibición reportadas en este estudio para desarrollar líneas de investigación relacionadas a la heteroresistencia en cepas aisladas de alimentos.

13. Referencias

1. Abushaheen, M. A., Muzahed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month: DM*, 66(6). <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
2. Acevedo Ocampo, C. Análisis de la resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2023.
3. Andersson, D. I., Nicoloff, H., & Hjort, K. (2019). Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(8), 479–496. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0218-1>
4. Asfaw, T., Genetu, D., Shenkute, D., Shenkutie, T. T., & Yitayew, B. (2023). Commonly consumed vegetables as a potential source of multidrug-resistant and β -lactamase-producing bacteria in Debre Berhan town, Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*, 16, 3693–3705. <https://doi.org/10.2147/IDR.S412126>
5. Balbuena-Alonso, M. G., Camps, M., Cortés-Cortés, G., Carreón-León, E. A., Lozano-Zarain, P., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2023). Strain belonging to an emerging, virulent sublineage of ST131 *Escherichia coli* isolated in fresh spinach, suggesting that ST131 may be transmissible through agricultural products. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1237725>
6. Band, V. I., & Weiss, D. S. (2021). Heteroresistance to beta-lactam antibiotics may often be a stage in the progression to antibiotic resistance. *PLoS Biology*, 19(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001346>
7. Baquero, F., Martínez, J. L., F Lanza, V., Rodríguez-Beltrán, J., Galán, J. C., San Millán, A., Cantón, R., & Coque, T. M. (2021). Evolutionary pathways and trajectories in antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00050-19>

8. Barrow GI, Feltham RKA, editores. Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria. 3a ed. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press; 2004.
9. Bastidas-Caldes, C., Guerrero-Freire, S., Ortuño-Gutiérrez, N., Sunyoto, T., Gomes-Dias, C. A., Ramírez, M. S., Calero-Cáceres, W., Harries, A. D., Rey, J., de Waard, J. H., & Calvopiña, M. (2023). Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in humans and backyard animals in Ecuador. *Pan American Journal of Public Health*, 47. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.48>
10. Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E. J., Clifton-Hadley, F. A., Stallwood, A. D., Davies, R. H., & Liebana, E. (2005). *bla*(CTX-M) genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1319–1322. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1319-1322.2005>
11. Bertrand, S., Weill, F.-X., Cloeckert, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., Dierick, K., Wildemaue, C., Godard, C., Butaye, P., Imberechts, H., Grimont, P. A. D., & Collard, J.-M. (2006). Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2897–2903. <https://doi.org/10.1128/JCM.02549-05>
12. Blanco-Meneses, M., Castro-Zúñiga, O., & Calderón-Abarca, A. (2023). Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. <https://doi.org/10.15517/rac.v47i1.53967>
13. 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 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6), 2056–2058. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.6.2056-2058.2003>
14. Brisse, S., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006). The Genus *Klebsiella*. *The Prokaryotes* (pp. 159–196). https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30746-X_8.

15. Burger, R. (2012). *EHEC O104:H4 in Germany 2011: Large outbreak of bloody diarrhea and haemolytic uraemic syndrome by shiga toxin-producing E. coli via contaminated food*. National Academies Press.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114499/>
16. Carreón León, E. *Estudio molecular de la resistencia y virulencia de cepas de Escherichia coli productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de vegetales crudos*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2019.
<https://hdl.handle.net/20.500.12371/4692>
17. Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3). <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
18. CDC. (10 de enero de 2019). *Brote de infecciones por E. coli vinculado a la lechuga romana*. B. CDC Archive.
https://archive.cdc.gov/www_cdc_gov/ecoli/2018/o157h7-11-18/index-esp.html
19. CDC. (17 de mayo de 2024). *About: Food Safety*. CDC.
https://www.cdc.gov/food-safety/about/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html
20. CEDRSSA. (febrero de 2020). *Análisis de la producción y consumo de hortalizas*. [Archivo PDF]. Cámara de Diputados.
http://intra.cedrssa.gob.mx/files/b/13/88Análisis_producción_consumo_hortalizas.pdf
21. Chelaghma, W., Loucif, L., Bendahou, M., & Rolain, J.-M. (2021). Vegetables and fruit as a reservoir of β -lactam and colistin-resistant Gram-negative bacteria: A review. *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122534>
22. Chen, J. C., Patel, K., Smith, P. A., Vidyaprakash, E., Snyder, C., Tagg, K. A., Webb, H. E., Schroeder, M. N., Katz, L. S., Rowe, L. A., Howard, D., Griswold, T., Lindsey, R. L., & Carleton, H. A. (2023). Reoccurring *Escherichia coli* O157:H7 strain linked to leafy greens-associated outbreaks, 2016-2019. *Emerging Infectious Diseases*, 29(9), 1895–1899. <https://doi.org/10.3201/eid2909.230069>

23. Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, Pa: Clinical And Laboratory Standards Institute; 2024
24. Contreras, J. D., Trangucci, R., Felix-Arellano, E. E., Rodríguez-Dozal, S., Siebe, C., Riojas-Rodríguez, H., Meza, R., Zelner, J., & Eisenberg, J. N. S. (2020). Modeling spatial risk of diarrheal disease associated with household proximity to untreated wastewater used for irrigation in the Mezquital Valley, Mexico. *Environmental Health Perspectives*, 128(7), 77002. <https://doi.org/10.1289/EHP6443>
25. Coque, T. M., Oliver, A., Pérez-Díaz, J. C., Baquero, F., & Cantón, R. (2002). Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 500–510. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.500-510.2002>
26. Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Torres, C., Castañeda, M., Sánchez, G. M., Alonso, C. A., López-Pliego, L., Mayen, M. G. G., Martínez-Laguna, Y., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2016). Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* strains producers of extended-spectrum and CMY-2 type beta-lactamases, isolated from turtles in Mexico. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 16(9), 595–603. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1725>
27. Cruz-Monterrosa, R. G. (2018). Riesgos de contaminación en alimentos consumidos en la calle. *Agro Productividad*, 11(11). <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1290>
28. De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14). <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>
29. De León Rosales, SP. (octubre de 2023). *Resistencia antimicrobiana de 2017 a 2022. Reporte de los hospitales de la Red PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antibióticos* [Archivo PDF]. PUIRE. <http://www.puis.unam.mx/divulgacion/pucra.php>

30. Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(1), 37–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
31. Estrada, O. y Rojas, H. (diciembre de 2016). *Reúso de aguas residuales en la agricultura*. Gob.mx. Recuperado el 14 de octubre de 2024, de https://www.imta.gob.mx/biblioteca/libros_html/riego-drenaje/reuso-aguas-residuales.pdf
32. Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
33. Food and Agriculture Organization, & World Health Organization. (21 de junio de 2018). *Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and food: Attribution, characterization and monitoring*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514279>
34. Food and Drug Administration (noviembre de 2023). *Outbreak investigation of salmonella: Cantaloupes*. FDA. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-salmonella-cantaloupes-november-2023>
35. Freitag, C., Michael, G. B., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Hassel, M., & Schwarz, S. (2018). Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. *Veterinary Microbiology*, 219, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.028>
36. Ghimire, A., Upadhyaya, J., Nayaju, T., Lekhak, B., Chaudhary, D. K., Raghavan, V., Pant, B. R., Bajgai, T. R., Koirala, N., & Upreti, M. K. (2020). Microbial and parasitic contamination of fresh raw vegetable samples and detection of the *bla*TEM and *bla*CTX-M genes from *E. coli* isolates. *Agriculture*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/agriculture10080341>
37. Gomes, M. P., Richardi, V. S., Bicalho, E. M., da Rocha, D. C., Navarro-Silva, M. A., Soffiatti, P., Garcia, Q. S., & Sant'Anna-Santos, B. F. (2019). Effects of Ciprofloxacin and Roundup on seed germination and root development of maize. *The Science of the Total Environment*, 65, 2671–2678. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.365>

38. 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. (2016). Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. *Food Microbiology*, 59, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.014>
39. Grace, D. (2023). Burden of foodborne disease in low-income and middle-income countries and opportunities for scaling food safety interventions. *Food Security*, 15(6), 1475–1488. <https://doi.org/10.1007/s12571-023-01391-3>
40. Guevara, Y., & Maselli, A. (2005). Bacteriosis en Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) causada por *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson en Venezuela. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 97–100. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223114>
41. Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, 4(3), 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>
42. Hopkins, K. L., Deheer-Graham, A., Threlfall, E. J., Batchelor, M. J., & Liebana, E. (2006). Novel plasmid-mediated CTX-M-8 subgroup extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-40) isolated in the UK. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(6), 572–575. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.03.003>
43. Husna, A., Rahman, M. M., Badruzzaman, A. T. M., Sikder, M. H., Islam, M. R., Rahman, M. T., Alam, J., & Ashour, H. M. (2023). Extended-spectrum β -lactamases (ESBL): Challenges and opportunities. *Biomedicines*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112937>
44. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
45. Iglesias-Osores, S. (2020). Uso de colistina en el sector pecuario: necesidad de una prohibición global. *Acta médica peruana*, 37(1). <https://doi.org/10.35663/amp.2020.371.898>

46. Iglewski, B. H. (1996). *Pseudomonas*. En *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21413324/>
47. INAPAM (31 de julio de 2023). *Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) tienen mayor riesgo de contraerlas las personas adultas mayores*. SEGOB. Recuperado el 14 de octubre de 2024, de <https://www.gob.mx/inapam/articulos/las-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta-tienen-mayor-riesgo-de-contraerlas-las-personas-adultas-mayores>
48. Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
49. Khalil, I. A., Troeger, C., Blacker, B. F., Rao, P. C., Brown, A., Atherly, D. E., Brewer, T. G., Engmann, C. M., Houpt, E. R., Kang, G., Kotloff, K. L., Levine, M. M., Luby, S. P., MacLennan, C. A., Pan, W. K., Pavlinac, P. B., Platts-Mills, J. A., Qadri, F., Riddle, M. S., ... Reiner, R. C., Jr. (2018). Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990-2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1229–1240. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30475-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30475-4)
50. Kon, H., Lurie-Weinberger, M., Cohen, A., Metsamber, L., Keren-Paz, A., Schwartz, D., Carmeli, Y., & Schechner, V. (2023). Occurrence, typing, and resistance genes of ESBL/AmpC-producing *Enterobacterales* in fresh vegetables purchased in central Israel. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101528>
51. Kumar, S. B., Arnipalli, S. R., & Ziouzenkova, O. (2020). Antibiotics in food chain: The consequences for antibiotic resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100688>
52. Lee, E., Radu, S., Jambari, N. N., & Abdul-Mutalib, N. A. (2021). Prevalence and antibiogram profiling of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in raw vegetables, in Malaysia. *Biology and life sciences forum*, 6 (1). <https://doi.org/10.3390/Foods2021-10960>

53. Lee, S. H., Jeong, S. H., & Lee, K. J. (2001). Evolution of TEM β -lactamase genes identified by PCR with newly designed primers in Korean clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 7(2), 98–100. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00202.x>
54. 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. https://doi.org/10.1007/82_2012_303
55. Lima, L. M., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208(112829), 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
56. Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M. P., Martínez de la Peña, C., Silva, J. L., & Luna-Guevara, M. L. (2019). The role of pathogenic *E. coli* in fresh vegetables: Behavior, contamination factors, and preventive measures. *International Journal of Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2894328>
57. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
58. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
59. Meher Nipa, Reaz Mohammad Mazumdar, Md Mahmudul Hasan, Iqbal A. (2011) Prevalence of Multi Drug Resistant Bacteria on Raw Salad Vegetables Sold in Major Markets of Chittagong. *Middle East Journal of Scientific Research*. 10(1), 70–7.

<https://www.researchgate.net/publication/52005200> Prevalence of Multi Drug Resistant Bacteria on Raw Salad Vegetables Sold in Major Markets of Chittagong City Bangladesh

60. Mercier, J., & Levesque, R. C. (1990). Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 beta-lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(8), 1577–1583. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.8.1577>
61. Michael, G. B., Freitag, C., Wendlandt, S., Eidam, C., Feßler, A. T., Lopes, G. V., Kadlec, K., & Schwarz, S. (2015). Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future Microbiology*, 10(3), 427–443. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.93>
62. Morrison, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 30(4), 619–635. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
63. Mueller, M., & Tainter, C. R. (13 de julio de 2023). *Escherichia coli* infection. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
64. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *American Society for Microbiology*. 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
65. Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 29(7), 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
66. Oh, S.-S., Han, S.-J., Gong, Y.-W., Nam, H.-J., Kim, K.-A., Kim, N.-Y., Kim, K.-S., Lee, D.-G., Shin, H.-K., Lee, H.-B., Kwon, M.-J., & Chae, J.-S. (2021). Investigation of pathogenic *Escherichia coli* contamination of vegetables distributed in a Korean agricultural wholesale market. *Foodborne Pathogens and Disease*, 18(12), 887–893. <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0027>
67. OMS (2016). *Plan de Acción Mundial Contra la Resistencia a Antibióticos*. WHO.gob. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>

68. OP Bansal. (2022). Antibiotics in the environment: A review. *International Journal of Frontiers in Biology and Pharmacy Research*, 2(1), 057–083. <https://doi.org/10.53294/ijfbpr.2022.2.1.0030>
69. Ortega-Paredes, D., Barba, P., Mena-López, S., Espinel, N., & Zurita, J. (2018). *Escherichia coli* hyperepidemic clone ST410-A harboring blaCTX-M-15 isolated from fresh vegetables in a municipal market in Quito-Ecuador. *International Journal of Food Microbiology*, 280, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.037>
70. Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M. M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., & Rossolini, G. M. (2003). Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4264–4269. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4264-4269.2003>
71. Patra, M., Pandey, B., & Dubey, S. K. (2024). Prevalence of diverse antimicrobial resistance genes and bacteria in sewage treatment plant-derived sludge environment. *FEMS Microbes*, 5. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtae004>
72. Pintor-Cora, A., Álvaro-Llorente, L., Otero, A., Rodríguez-Calleja, J. M., & Santos, J. A. (2021). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in fresh produce. *Foods*, 10(11), 2609. <https://doi.org/10.3390/foods10112609>
73. Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The diversity of *Escherichia coli* pathotypes and vaccination strategies against this versatile bacterial pathogen. *Microorganisms*, 11(2), 344. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>
74. Prasannamedha, G., & Kumar, P. S. (2020). A review on contamination and removal of sulfamethoxazole from aqueous solution using cleaner techniques: Present and future perspective. *Journal of Cleaner Production*, 250(119553). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119553>
75. Priyanka, Meena, P. R., Meghwanshi, K. K., Rana, A., & Singh, A. P. (2021). Leafy greens as a potential source of multidrug-resistant diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Microbiology (Reading, England)*, 167(6). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001059>

76. Rodionova, I. A., Hosseinnia, A., Kim, S., Goodacre, N., Zhang, L., Zhang, Z., Palsson, B., Uetz, P., Babu, M., & Saier, M. H., Jr. (2023). *E. coli* allantoinase is activated by the downstream metabolic enzyme, glycerate kinase, and stabilizes the putative allantoin transporter by direct binding. *Scientific Reports*, 13(1), 7345. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31812-4>
77. Rodríguez López, J., Grande Burgos, M. J., Pérez Pulido, R., Iglesias Valenzuela, B., Gálvez, A., & Lucas, R. (2022). Antimicrobial resistance, biocide tolerance, and bacterial diversity of a dressing made from coriander and parsley after application of treatments using high hydrostatic pressure alone or in combination with moderate heat. *Foods*, 11(17), 2603. <https://doi.org/10.3390/foods11172603>
78. Scazzocchio, F., Mondì, L., Ammendolia, M. G., Goldoni, P., Comanducci, A., Marazzato, M., Conte, M. P., Rinaldi, F., Crestoni, M. E., Frascchetti, C., & Longhi, C. (2017). Coriander (*Coriandrum sativum*) Essential Oil: Effect on Multidrug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli*. *Natural Product Communications*, 12(4), 623–626. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701200438>
79. Secretaría de Salud (19 de octubre de 1995). QDEUM-S. 10-19-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. DOF-Diario Oficial de la Federación. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69535.pdf>
80. Secretaría de Salud (4 de octubre de 1995). Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. DOF-Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4882432&fecha=04/10/1995#gsc.tab=0
81. SENASICA (agosto de 2014). Acciones para reducir los riesgos de contaminación por microorganismos patógenos (*Cyclospora spp.*, *Listeria spp.*, *E. coli* y *Salmonella spp.*), durante la producción, empaque y distribución de cilantro, para su comercialización dentro y fuera del país. Gob.mx.

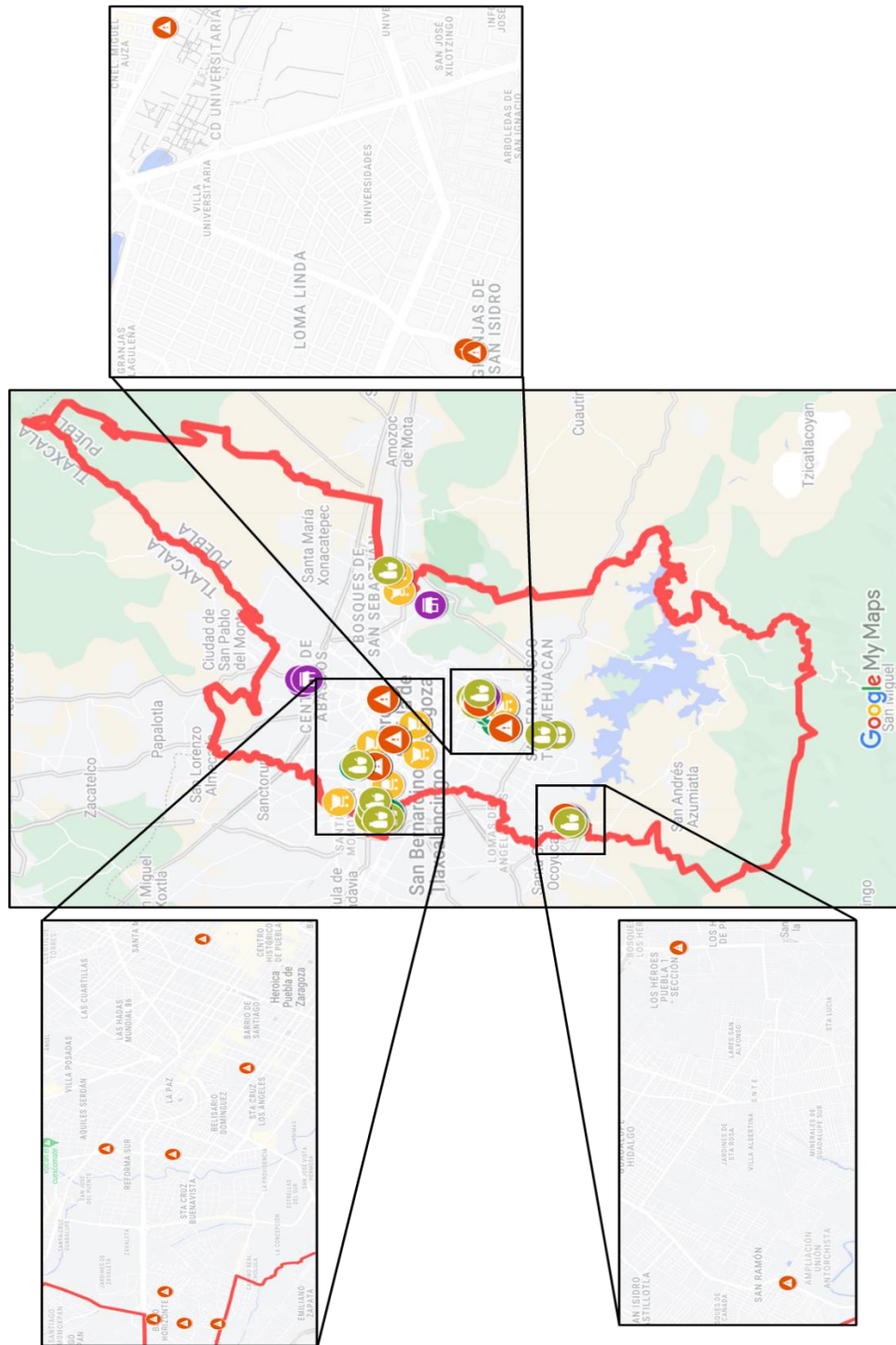
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257729/PLANDEACCI_NCILA_NTRO.pdf

82. SIAP. (febrero de 2024). *Anuario estadístico de la producción agrícola: Cierre_agr_mun_2023* [Archivo Excel]. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. https://nube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/
83. Sojo-Dorado, J., López-Hernández, I., Rosso-Fernandez, C., Morales, I. M., Palacios-Baena, Z. R., Hernández-Torres, A., Merino de Lucas, E., Escolà-Vergé, L., Bereciartua, E., García-Vázquez, E., Pintado, V., Boix-Palop, L., Natera-Kindelán, C., Sorlí, L., Borrell, N., Giner-Oncina, L., Amador-Prous, C., Shaw, E., Jover-Saenz, A. (2022). Effectiveness of fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant *Escherichia coli* bacteremic urinary tract infections: A randomized clinical trial. *JAMA Network Open*, 5(1). <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.37277>
84. Song, J., Oh, S.-S., Kim, J., & Shin, J. (2020). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from raw vegetables in South Korea. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76890-w>
85. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
86. Tresch, S., Biggel, M., Schnyder, M., Nüesch-Inderbinen, M., & Stephan, R. (2024). Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing *Enterobacterales* isolated from fresh herbs and salads at retail level in Switzerland. *Journal of Food Protection*, 87(11). <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100368>
87. Tutone, M., Bjerklund Johansen, T. E., Cai, T., Mushtaq, S., & Livermore, D. M. (2022). Susceptibility and Resistance to Fosfomycin and other antimicrobial agents among pathogens causing lower urinary tract infections: findings of the SURF study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 59(5). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106574>
88. U.S. Food and Drug Administration (22 de agosto de 2022). *Import Alert 24-23*. Accessdata.fda: https://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_1148.html

89. UK Health Security Agency (27 de junio de 2024). *Investigation into an outbreak of Shiga toxin-producing E. coli (STEC) O145 in Great Britain, May to June 2024*. Gov.uk. Recuperado el 14 de octubre de 2024, de <https://www.gov.uk/government/publications/shiga-toxin-producing-e-coli-outbreak-o145-may-to-june-2024/investigation-into-an-outbreak-of-shiga-toxin-producing-e-coli-stec-o145-in-great-britain-may-to-june-2024>
90. Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S., León-Chávez, B. A., Thompson-Bonilla, M. R., Guerrero-González, T., Gómez-Conde, E., Martínez-Fong, D., & González-Barrios, J. A. (2018). Characterization of gene families encoding beta-lactamases of gram-negative rods isolated from ready-to-eat vegetables in Mexico City. *High-Throughput*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/ht7040036>
91. Vázquez-Quñones, C. R., Rincón-Guevara, M. A., Natividad-Bonifacio, I., Vázquez-Salinas, C., & González-Márquez, H. (2024). Incidence and multidrug resistance of *Escherichia coli* pathotypes on fresh vegetables and salads. En *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.07.18.604175>
92. Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Mowlem, M. C., & Lees, D. N. (2017). A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Research*, 126, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>
93. Williams, D. J., Grimont, P. A. D., Cazares, A., Grimont, F., Ageron, E., Pettigrew, K. A., Cazares, D., Njamkepo, E., Weill, F.-X., Heinz, E., Holden, M. T. G., Thomson, N. R., & Coulthurst, S. J. (2022). The genus *Serratia* revisited by genomics. *Nature Communications*, 13(1), 5195. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32929-2>
94. World Health Organization. (17 de mayo de 2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. World Health Organization [Archivo PDF]. WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

95. World Health Organization. (2022). *WHO global strategy for food safety 2022-2030: towards stronger food safety systems and global cooperation*. World Health Organization.
96. World Health Organization. (4 de octubre de 2024). *Inocuidad de los alimentos*. WHO. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
97. Yu, K., Huang, Z., Xiao, Y., Gao, H., Bai, X., & Wang, D. (2024). Global spread characteristics of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases: A genomic epidemiology analysis. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 73(101036). <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.101036>
98. Zhang, G., Chen, Y., Hu, L., Melka, D., Wang, H., Laasri, A., Brown, E. W., Strain, E., Allard, M., Bunning, V. K., Parish, M., Musser, S. M., & Hammack, T. S. (2018). Survey of foodborne pathogens, aerobic plate counts, total coliform counts, and *Escherichia coli* counts in leafy greens, sprouts, and melons marketed in the United States. *Journal of Food Protection*, 81(3), 400–411. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-253>

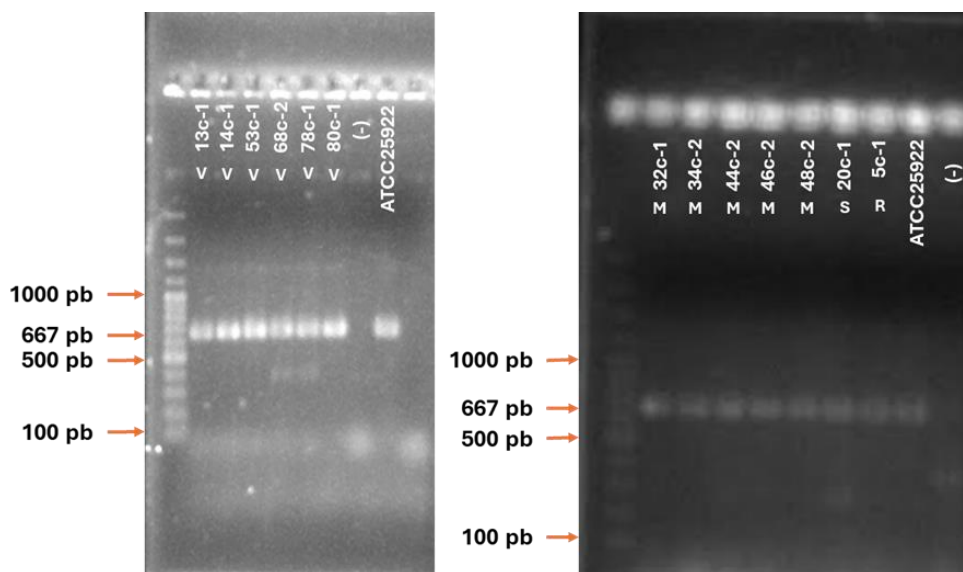
14. Anexos



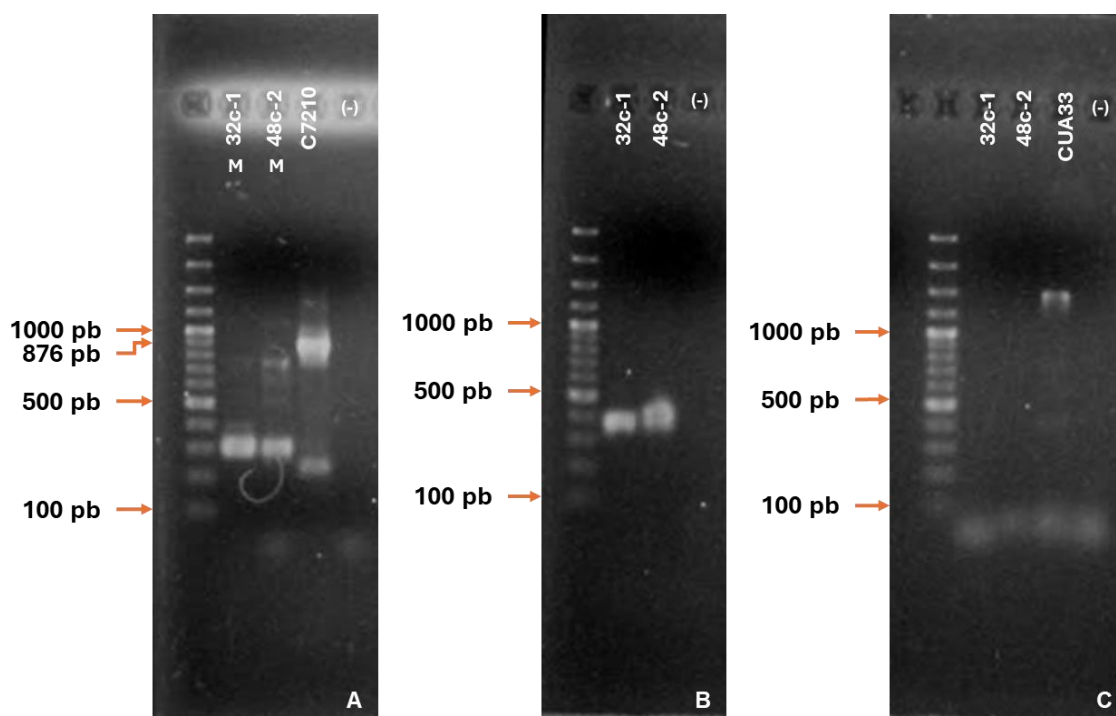
Anexo 1: Mapa de las localizaciones de los locales muestreados y la presencia de *E. coli*. El símbolo de advertencia en color rojo significa la presencia de *E. coli*. Para una mayor definición, el mapa se encuentra disponible en: <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=1LcyjHkPqrH52zj18op6jN8SavPePRTg&usp=sharing>

Tabla A1: Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de <i>E. coli</i>												
Muestra	Origen	Cepa	G	Lactosa	Pruebas bioquímicas							Posible microorganismo identificado
					T.S.I.	L.I.A.	Citrato	Urea	M	I	O	
5	Restaurante	5C-1	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
13	Mercado	13C-1	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
14	Mercado	14C-1	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
20	Supermercado	20C-1	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
32	Verdulería	32C-1	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
34	Verdulería	34C-2	-	Fermentador	AA	KK	-	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
44	Verdulería	44C-2	-	Fermentador	AA	KK	-	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
46	Verdulería	46C-2	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
48	Verdulería	48C-2	-	Fermentador	AA	KK	-	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
53	Mercado	53C-1	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
68	Mercado	68C-2	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
78	Mercado	78C-1	-	Fermentador	AA	KK	-	-	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
80	Mercado	80C-1	-	Fermentador	AA	KK	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>

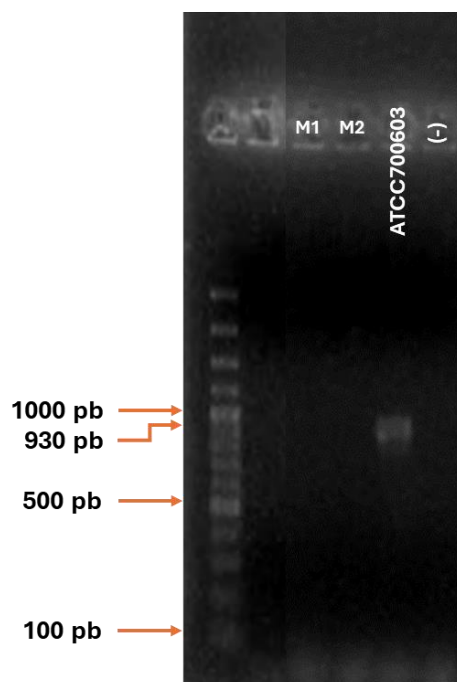
Anexo 2: Resultados de las pruebas bioquímicas distintivas de *E. coli*. G: gram negativo; TSI: Agar de triple azúcar y hierro; LIA: Agar Lisina y Hierro; M: Movilidad; I: Indol; O: Ornitina; AA: Ácido/Ácido; KK: Básico/Básico



Anexo 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la amplificación del gen *ybbW* (667 pb) para la identificación de *E. coli*. El control positivo en ambos paneles es la cepa *E. coli* ATCC25922. V: verdulería; M: mercado; S: supermercado; R: restaurante; pb: pares de bases.



Anexo 4: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los genes *bla*_{CTX-M-2} (A), *bla*_{CTX-M-8} (B) y *bla*_{CTX-M-9} (C) en cepas de *E. coli* recolectadas de cilantro. En el panel A el control positivo es C7210, mientras que, en los otros paneles, no se presentan controles positivos.



Anexo 5: Determinación de la presencia del gen *bla*_{SHV} en cepas de *E. coli* en cilantro. En el carril no. 3 está la mezcla (M1) de las cepas: 13c-1, 14c-1, 53c-1, 68c-2, 78c-1, 80c-1 (Verdulería) y en el carril 4 está la mezcla (M2) de las cepas: 32c-1; 34c-2; 44c-2; 46c-2; 48c-2 (Mercado); 20c-1 (Supermercado); 5c-1 (Restaurante).

Anexo 6:

- **Recursos materiales**

- **Antibióticos**

- Cefotaxima en polvo
 - Sensidiscos (**Tabla 4**)

- **Aparatos**

- Agitador Vórtex
 - Balanza
 - Balanza analítica
 - Cámara de electroforesis
 - Centrífuga
 - Densitómetro
 - Espectrofotómetro nanodrop2000
 - Incubadora
 - Incubadora orbital
 - Microscopio óptico
 - Transiluminador

- **Materiales**

- Agarosa
 - Agua inyectable estéril PiSA
 - Agua tridestilada
 - Asa de siembra roja
 - Bolsas Whirl Pack
 - Crioviales de 1.5 ml
 - Geles refrigerantes
 - Glicerol
 - Hieleras de unicel
 - Hisopos de algodón
 - Matraces de 150 ml
 - Micropipetas de 2, 10, 100 y 1000 μ l
 - Microtubos de 10, 100 y 1000 μ l

- Perlas de ebullición
- Pinzas
- Placas Petri de 15 y 25 ml
- Portaobjetos
- Tubos de vidrio con rosca de 20 ml
- Tubos falcon de 50 ml
- Medios de cultivo
- Agar BHI
- Agar Citrato de Simmons
- Agar LIA
- Agar MacConkey
- Agar MIO
- Agar Müller Hinton
- Agar TSA
- Agar TSI
- Agar Urea de Christensen
- Caldo Lauril-Sulfato de sodio
- **Reactivos**
 - Aceite de inmersión
 - Alcohol-acetona
 - Bromuro de etidio
 - Componentes de la PCR (**Tabla 3**)
 - Cristal violeta
 - Lugol
 - Safranina
- **Recursos financieros**

El presente proyecto fue financiado con recursos del proyecto de CONAHCYT de la Convocatoria 2017-2018 de Ciencia Básica (Convocatoria-2018-4; FSSEP02-C-2018-4). Proyecto con clave A1-S-22136, en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias

Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Investigador responsable: Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia.

- **Bioética**

Ninguna consideración bioética se aplicó para este proyecto, sin embargo, el proyecto fue regido con las normas establecidas por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad para el trabajo con microorganismos potencialmente patógenos y MDR. Además, los resultados se mantuvieron y se mantendrán en anonimato a resguardo de la Dra. Rocha directora del proyecto.

- **Actividades adicionales**

Participaciones en congresos:

- a) Asistencia al **Congreso Nacional de Biotecnología: Biogénesis 2.0** llevado a cabo del 5 al 7 de mayo de 2022 en Guerrero:



- b) Asistencia al **Congreso Nacional de Biotecnología: Biogénesis 3.0** llevado a cabo del 19 al 21 de mayo de 2023 en Nayarit:



- c) Participación en el **Congreso LatinFood 2024. Autores:** José de Jesús García Pérez, María Guadalupe Balbuena Alonso, Patricia Lozano Zaráin, Ana María Gonzales Villoria y Rosa del Carmen Rocha Gracia. **Título:** Identification and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* strains isolated from fresh cilantro. **Presentación en modalidad póster. Fecha:** 12 de noviembre de 2024:



Actividades de divulgación:

- a) **Tercer concurso de infografías y podcast de divulgación científica del ICUAP 2024. Autores:** Rosa del Carmen Rocha Gracia, María Guadalupe Balbuena Alonso, Luis Mario Ibarra Moreno y José de Jesús García Pérez. **Título:** *Escherichia coli*: ¿Amiga o enemiga? **Presentación en modalidad infografía. Ganador del 3er lugar en el concurso. Fecha:** 29 de octubre de 2024:



- b) **Participación** en el recorrido “**El símbolo de la resistencia: las Superbacterias**”, llevado a cabo en la celebración del evento “**Puertas Abiertas BUAP 2022**” el 3 de diciembre de 2022:



- c) **Plática** impartida a alumnos del 5° semestre del área de la salud de la preparatoria "Enrique Cabrera Barroso" con título: **Microorganismos en nuestra dieta**:



ASUNTO: "CONSTANCIA"

A QUIEN CORRESPONDA:

La que suscribe Mtra. Alma Lilia Varela Olguín, Directora de la preparatoria urbana "Profesor Enrique Cabrera Barroso", de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, hace constar que el (la) alumno (a):

***** JOSÉ DE JESÚS GARCÍA PÉREZ *****
201917578

Impartió una **Plática** denominada Somos lo que comemos: "**Microorganismos en nuestra dieta**" a los alumnos de 5° semestre del área de la salud de esta preparatoria, llevado a cabo el día **16 de mayo de 2024**, en las instalaciones de esta unidad académica.

A petición del (la) interesado (a) se extiende la presente Constancia, para los fines que el interesado estime conducente.

ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"
H. PUEBLA, DE Z., A 17 DE MAYO DE 2024

MTRA. ALMA LILIA VARELA OLGUÍN
DIRECTORA
ALVO/ani



Escuela Preparatoria
Urbana "Enrique
Cabrera Barroso"

Río Sabinas 6109, Col. Jardines
de San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
Tel: (222) 244 1001
Corre: direccion.puecb@correo.buap.mx

Otras actividades:

- a) Participación en el curso “**Análisis de secuencias de DNA y proteínas por métodos bioinformáticos**” llevado a cabo entre el 7 de septiembre al 30 de noviembre de 2022:



BUAP

Registro:
DGEIC - BUAP - ICUAP - L / CT - 060 / 22
Folio: 27, Foja 175
Del libro de Registros 01/23

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
A través del Instituto de Ciencias (ICUAP)
otorga la presente

CONSTANCIA DE ACTUALIZACIÓN

A: **José de Jesús García Pérez**

Por haber concluido de manera satisfactoria el Curso - Taller
Análisis de secuencias de DNA y proteínas por métodos bioinformáticos
Realizado en línea del 07 de septiembre al 30 de noviembre de 2022
Valor Curricular: 48 horas

“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 15 de febrero de 2023


Dr. Carlos Contreras Cruz
Director General de Educación Continua



- b) Participación en el curso de “Farmacología” llevado a cabo entre el 31 de julio al 8 de agosto de 2021:



BioAdviser S. A. de C. V. otorga la presente

CONSTANCIA A:

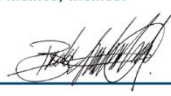
José de Jesús García Pérez

por haber concluido satisfactoriamente el curso online:

“Farmacología”

Llevado a cabo los días 31 de julio, 1, 7 y 8 de agosto del 2021,
con una duración de 10 horas. Ciudad de México, México.


M. en C. Moisés Cabrera González
Director Académico


Q.F.I. Brenda Domínguez Maldonado
Capacitador