



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**“ANÁLISIS DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES QUE  
ACARREAN GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS  
EN *Escherichia coli* AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. LORENA BABINES OROZCO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D.C. YGNACIO MARTÍNEZ LAGUNA**

**CODIRECTORA DE TESIS:**

**D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA**

**PUEBLA, PUE.**

**ENERO, 2025**





**BUAP**

Puebla, Pue. a 23 de enero 2025.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría de la alumna **Lorena Babines Orozco**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


**“Análisis parcial de elementos genéticos móviles que acarrean genes de resistencia en *Escherichia coli* presente en productos cárnicos”**

A nuestro juicio, la alumna **Lorena Babines Orozco** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

  
D.C. Patricia Lozano Zarain

  
D.C. Gerardo Cortés Cortés

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

  
D.C. Edwin Barrios Villa

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser mi alma mater, por todo el apoyo desde la licenciatura hasta la maestría y por permitirme formar parte de esta máxima casa de estudios.
- Al Instituto de Ciencias junto con todo su personal por todo el apoyo y disponibilidad de las instalaciones y apoyos para la participación en congresos.
- Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, por aceptarme en el programa de Posgrado en Microbiología, por el conocimiento obtenido mediante toda la comunidad que conforma este centro y permitirme formarme como profesionista.
- Al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de investigación, por todo el aprendizaje de las técnicas utilizadas y ser mi segunda casa estos años, es un orgullo haber sido parte de un grupo de trabajo tan valioso.
- A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto, así como por el apoyo dado para la participación del XLVIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica en la ciudad de Puebla, Puebla.
- Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, por la beca otorgada durante los estudios de maestría, con número de becario 822131. Esta tesis forma parte de los proyectos de CONAHCYT de la convocatoria 2017-2018 de Ciencia Básica 2018-4; FSSEP02-C-2018-4, proyecto con clave A1-S-22136

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A mi asesor el **D.C. Ygnacio Martínez Laguna**, por confiar en mí y siempre tener disposición frente al proyecto de investigación, por el apoyo brindado en cada momento y por ser un docente presente. Muchas GRACIAS por que sin su apoyo el anhelo de este proyecto no habría sido posible.
- A mi asesora la **D.C. Rosa Del Carmen Rocha Gracia**, por ser una inspiración formidable, por ser una buena persona, una buena docente y una mujer determinante, por confiar en mí y permitirme trabajar con ella junto con su grupo de trabajo, por siempre tener tiempo para sus alumnos, por darme todo su apoyo y paciencia en este proceso, espero haber cumplido con sus expectativas como alumna, y sino, al menos no haberla decepcionado. Muchas GRACIAS por que usted fue y ha sido importante para la realización de este sueño. ¡La estimo mucho!
- A la **D.C. Patricia Lozano Zaráin**, por ser la primera doctora en abrirme las puertas del laboratorio, por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por ser una docente tan firme y determinada, por ser una inspiración, por su paciencia y el apoyo frente a tantas enseñanzas tanto en clases como fuera de ellas, llevaré siempre su frase “El cerebro es el aparato más importante que nunca debes dejar de usar”. Muchas gracias por todo. ¡La estimo mucho!
- Al **D.C. Gerardo Cortes Cortes**, porque antes de ser un magnifico doctor, es una buena persona y un gran amigo, por todo su apoyo, paciencia y sugerencias para llevar adelante este proyecto, por su disponibilidad de tiempo y energía aún con tantas ocupaciones y a una larga distancia, ha sido una inspiración total. Espero haber logrado un poco del desempeño que esperaba como su alumna y ansío seguir sus pasos. Muchas gracias por todos sus consejos, tanto dentro del proyecto como fuera de él, Muchas GRACIAS. ¡Lo estimo mucho!
- A la **D.C. Margarita María De La Paz Arenas Hernández**, por ser una docente admirable, por su conocimiento, sus enseñanzas y por el apoyo y consejos para el desarrollo de este proyecto, por su orientación y contribución al compartirnos de sus reactivos que ayudaron al desarrollo de esta tesis. Muchas GRACIAS.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- *A Dios*

Por darme vida, fuerza y salud ante las adversidades, por acompañarme y cuidar de todas las personas que amo, por ayudarme y escucharme aun cuando yo misma no podía hacerlo.

- *A mis padres: Don Lupe y Señora Esperanza*

Por su energía, su fuerza y su amor, porque me han dado todo para salir adelante, porque me han enseñado a luchar y esforzarme por cada meta en la vida, porque me han apoyado incondicionalmente y nunca me dejaron sola, porque espero un día poder retribuirles lo mucho que han dado por mi, y deseo hacerlos sentir orgullosos. LOS AMO MUCHO.

- *A mis hermanos*

Raúl, porque a pesar de no tolerarlo cuando me despertaba, ha estado conmigo, me ha apoyado y ha visto por mi a su manera, incluso estando lejos, y Carlos, porque sin él simplemente no habría podido mantenerme en este proyecto, por apoyarme, por ser una persona noble y escucharme cada fin de semana, gracias por demostrarme su cariño a su modo, son un orgullo para mi.

- *A mi tía Hortensia y mi abuelita Lucia*

Porque nunca me dejaron sola aún con todas las ocupaciones que tenían, por apoyarme cuando más lo necesitaba y solventar con mucho amor necesidades que no podía cubrir, por su ánimo, su cariño y su amor incondicional, las quiero mucho.

- *A mis mejores amigos*

Sol, Carol, Sebastian y Héctor, por ser un apoyo incondicional en todo momento, por escuchar mis quejas, mis problemas y nunca dejarme sola, por sus consejos que seguramente se cansaban de repetirme y por nutrir una amistad de más de nueve años, los quiero tanto.

- *A los Colitos - Vitamina*

Mis niños Chuy y Luis Mario, por permitirme enseñarles lo poco que sé, por acompañarme y enseñarme a disfrutar cada experimento que hacia, por todos los lavados que hicimos junto con Cristian, por las conversaciones después de las 4 pm

y por ser tan incondicionales, divertidos y leales. ¡Son increíbles, son un orgullo para mi! Recuerden que los geles no se hacen con agua.

María, por ser una maravillosa amiga, mentora y mujer, porque sin su paciencia, sus enseñanzas, su bondad, sus consejos y su conocimiento, este proyecto no habría sido posible, tanto académicamente como personalmente, te debo tanto de mi y espero un día hacerte sentir orgullosa, gracias por tanto, gracias por nunca dejarme sola, gracias por acompañarme y ser una de mis personas favoritas, te quiero.

- *A mis amigos y compañeros*

Brenda, Armando, Diego y Sofi, por ser tan extraordinarios, por su amistad, sinceridad y compañía, porque abrir el corazón con ustedes es sentirse seguro.

Jessi, Edwin, Ale, Mar, Isa, Jorge, Judith, Nina, Rous, Joel y todos mis compañeros del posgrado, por su amistad y compañía dentro y fuera del laboratorio.

- *Y a todas las personas que han formado parte de mi vida*

Aunque algunas ya no estén conmigo, gracias por enseñarme de la vida y del amor, por permitirme conocerlos y aprender a su lado, gracias por acompañarme en este trayecto, gracias por cada momento, cada palabra y cada experiencia.

Finalmente agradezco y dedico esta tesis a mi poderosa computadora *hp* que me acompañó tantas noches en vela, que me vio reír, llorar y sufrir.

¡Muchas gracias a todos!

**"La inteligencia no es un privilegio, es un don. Y se usa en bien de la humanidad."**

- Doctor Otto Octavius

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	7
INDICE DE FIGURAS	10
INDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	2
1.2 <i>Escherichia coli</i>	2
1.3 <i>E. coli</i> en alimentos	3
1.4 Resistencia a los antibióticos	4
1.4.1 Resistencia a fosfomicina	5
1.4.2 Resistencia a colistina	6
1.5 Elementos genéticos móviles	7
1.5.1 Plásmidos	8
1.5.1.1 Caracterización plasmídica por PBRT	9
1.5.1.2 Caracterización plasmídica por relaxasas	9
1.5.1.3 Sistemas de adición de los plásmidos	10
1.5.2 Secuencias de Inserción	11
1.5.3 Transposones	12
2. ANTEDECENTES	13
2.1 GENERALES	13
2.2 ANTECEDENTES DIRECTOS	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVO	19
4. 2 OBJETIVO GENERAL	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	20
6. MATERIAL Y METODOS	21
6.1 Viabilidad y pureza de cepas de <i>E. coli</i>	21
6.2 Evaluación de susceptibilidad a colistina y fosfomicina	22
6.2.1 Perfil fenotípico de susceptibilidad a colistina y fosfomicina	22

6.2.2	Determinación de concentración mínima inhibitoria a colistina y fosfomicina	23
6.2.2.1	Preparación de medio	23
6.2.2.2	Preparación de la muestra	23
6.2.2.3	Inoculación de placas	24
6.3	Obtención de ADN bacteriano	24
6.3.1	Extracción por método de hervido	24
6.3.2	Extracción de ADN genómico	24
6.4	Cuantificación y pureza del ADN	24
6.5	Identificación del gen <i>stx</i> y genes de resistencia	25
6.5.1	Determinación de la presencia del gen <i>stx</i>	25
6.5.2	Genes de resistencia a colistina y fosfomicina	26
6.6	Visualización de los productos de PCR	27
6.7	Caracterización plasmídica	27
6.7.1	Determinación del tamaño y número de plásmidos	27
6.7.1.1	Preparación de insertos bacterianos	27
6.7.1.2	Lisis bacteriana	28
6.7.1.3	Lavado de los insertos	28
6.7.1.4	Digestión enzimática	28
6.7.1.5	Electroforesis	29
6.7.1.6	Tinción del gel y visualización	29
6.7.1.7	Modificaciones de la técnica	29
6.7.2	Identificación de la presencia de plásmidos por el método de Kieser	29
6.7.2.1	Visualización del gel de agarosa	30
6.7.3	Tipado de plásmidos por “PCR-based replicon typing” (PBRT)	31
6.7.4	Caracterización de plásmidos por relaxasas	33
6.7.5	Caracterización mediante sistemas de adicción plasmídica	34
6.8	Identificación de secuencias de inserción	35
6.9	Secuenciación y análisis de la secuenciación genómica	36
7.	RESULTADOS	38
7.1	Resultado de viabilidad y pureza de cepas de <i>E. coli</i>	38
7.2	Perfil fenotípico de susceptibilidad a colistina y fosfomicina	38
7.3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria a Colistina y Fosfomicina	38

7.4 Identificación de variantes de los genes <i>fosA</i> y <i>mcr</i> .	39
7.5 Búsqueda de genes que codifican a la toxina Shiga	41
7.6 Determinación del perfil plasmídico de las cepas de <i>E. coli</i> y caracterización plasmídica.	42
7.6.1 Perfil plasmídico de las cepas de <i>E. coli</i>	42
7.6.2 Caracterización plasmídica de las cepas de <i>E. coli</i>	45
7.7 Identificación de secuencias de inserción y transposones	48
7.7.1 Identificación de secuencias de inserción	48
7.7.2 Identificación de transposones	49
7.8 Análisis de la secuenciación genómica	50
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIONES	73
10. PERSPECTIVAS	74
REFERENCIAS	75
ANEXOS	86

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de plásmidos de la familia Inc según el tipo de relaxasa. _____	10
<b>Figura 2.</b> Resistencia hacia colistina y fosfomicina de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos cárnicos. _____	38
<b>Figura 3.</b> Electroforesis en geles de agarosa al 1% de los corrimientos electroforéticos de las PCR para la amplificación de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> . _____	42
<b>Figura 4.</b> Tamaño y porcentaje de plásmidos en cepas de <i>E. coli</i> aislada de cárnicos. ____	44
<b>Figura 5.</b> Comparación del porcentaje del tamaño de plásmidos de las cepas de <i>E. coli</i> de acuerdo con su origen. _____	45
<b>Figura 6.</b> Grupos de Incompatibilidad plasmídica presentes en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de cárnicos. _____	46
<b>Figura 7.</b> Relaxasas presentes en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de cárnicos. _____	47
<b>Figura 8.</b> Sistemas de adicción de los plásmidos presentes en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de cárnicos. _____	47
<b>Figura 9.</b> Características plasmídicas presentes en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de cárnicos. _____	48
<b>Figura 10.</b> Secuencias de inserción identificadas en las cepas de <i>E. coli</i> . _____	49
<b>Figura 11.</b> Transposones identificados en las cepas de <i>E. coli</i> . _____	49
<b>Figura 12.</b> Representación de los entornos genéticos de <i>fosA7.5</i> y <i>fosL</i> . _____	53
<b>Figura 13.</b> Genes de resistencia a antibióticos identificados en las cepas secuenciadas de <i>E. coli</i> aisladas de cárnicos. _____	55

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nomenclatura y características de las cepas de <i>E. coli</i> productoras y no productoras de BLEE y $\beta$ -lactamasas AmpC, aisladas de productos cárnicos. _____	21
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de antibiótico empleadas para la determinación de CMI. ____	23
<b>Tabla 3.</b> Componentes de PCR y su concentración, utilizados para la determinación de genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> . _____	25
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos y condiciones de PCR, usados para búsqueda del gen <i>stx</i> . ____	25
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos y condiciones de PCR, usados para búsqueda del gen <i>mcr-1</i> . ____	26
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos y condiciones de PCR, usados para búsqueda de genes involucrados en la resistencia a fosfomicina. _____	26
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos utilizados en el método PBRT para el tipado de plásmidos.____	31
<b>Tabla 8.</b> Componentes de PCR y su concentración utilizados en el método PBRT para el tipado de plásmidos. _____	32
<b>Tabla 9.</b> Oligonucleótidos usados para la determinación de las relaxasas MOB. _____	33
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleados en la búsqueda de los sistemas de adicción plasmídicos _____	35
<b>Tabla 11.</b> Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleados en la búsqueda de <i>ISEcpl e IS26</i> . _____	35
<b>Tabla 12.</b> Concentración Mínima Inhibitoria hacia fosfomicina y colistina de las 20 cepas de <i>E. coli</i> de alimentos (18 resistentes a fosfomicina y 2 resistentes a colistina). _____	39
<b>Tabla 13.</b> Determinación de las variantes de los genes <i>fosA</i> y <i>fosL</i> en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos cárnicos. _____	40
<b>Tabla 14.</b> Características del perfil de susceptibilidad frente a colistina y fosfomicina de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos cárnicos. _____	41
<b>Tabla 15.</b> Número y tamaño de plásmidos contenidos en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos cárnicos, obtenido mediante Electroforesis de Campos Pulsados con la enzima S1. _____	42
<b>Tabla 16.</b> Criterios de selección para secuenciación por tecnología Illumina de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de carne de cerdo y pollo. _____	50
<b>Tabla 17.</b> Filogrupos, serotipo y secuenciotipo de las cepas de <i>E. coli</i> secuenciadas. ____	51
<b>Tabla 18.</b> Características asociadas a resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> secuenciadas. ____	52

**Tabla 19.** Características identificadas en las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos. \_\_\_\_\_ 56

## ABREVIATURAS

AIEC	<i>E. coli</i> adherente invasiva
BET	Bromuro de Etidio
BHI	Medio Brain Heart Infusion
BLEE	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido
cAMP	AMP cíclico
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CyaA	Enzima adenilato ciclasa
DAEC	<i>E. coli</i> adherente difusa
DEC	<i>E. coli</i> diarreogénica
DPMT	Tipificación de Relaxasa MOB con Primers Degenerados
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EGM	Elementos genéticos móviles
EIEC	<i>E. coli enteroinvasora</i>
EMB	Agar Eosina y azul de metileno
EPEC	<i>E. coli enteropatógena</i>
ETEC	<i>E. coli enterotoxigénica</i>
ExPEC	<i>E. coli</i> patógena extraintestinal
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
IPEC	<i>E. coli</i> patógena intestinal
IS	Secuencias de inserción
kb	Kilobases
L	Litro
LB	Caldo Luria-Bertani

MDR	Multidrogorresistente
M	Molar
min	Minuto
mM	Milimolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Microgramos
µL	Microlitro
NMEC	<i>E. coli asociada a meningitis</i>
PBRT	Tipificación del Replicón Basada en PCR
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Electroforesis en Gel de Campos Pulsados
SSI	Solución Salina Isotónica
STEC o EHEC	<i>E. coli shigatoxigénica ó enterohemorrágica</i>
TA	Toxina-antitoxina
THG	Transferencia horizontal de genes
TSA	Agar soya tripticasa
UPEC	<i>E. coli uropatógena</i>

## RESUMEN

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos más frecuentemente asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos; además, ha presentado una elevada tasa de resistencia a los antibióticos alrededor del mundo debido a su alta plasticidad y su capacidad para adquirir y transferir genes a otras bacterias mediante la transferencia horizontal de genes, confiriendo resistencia a antibióticos no solo de uso común, sino también a antibióticos como fosfomicina, y de último recurso terapéutico, como colistina. El objetivo de este estudio fue analizar los elementos genéticos móviles que acarrean genes de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos. A partir de carne de cerdo y pollo, en 2009 se recolectaron 38 cepas de *E. coli* MDR, de las cuales se seleccionaron doce cepas para secuenciar su genoma mediante Illumina HiSeq 2500 ensamblado con Spades v3.15.4. Con el objetivo de asociar al patotipo STEC/EHEC con las ETA, se investigó la presencia del gen que codifica a la toxina shiga (*stx*); sin embargo, en ninguna de las cepas fue identificado dicho gen. A su vez, se evaluó el perfil fenotípico y genotípico de resistencia frente a fosfomicina y colistina de acuerdo con los estándares del CLSI 2024, encontrando que, el 50% (19/38) de las cepas presentaron susceptibilidad intermedia o resistente frente a fosfomicina, de las cuales más del 95% (18/19) fueron resistentes al presentar una concentración mínima inhibitoria  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$  (punto de corte:  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ ). Por medio de un análisis bioinformático se realizó la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos, donde se identificó *fosLI* en una cepa y *fosA7.5* en cinco cepas, siendo el primer estudio en México en reportar *fosA7.5* en plásmidos. Así mismo, cerca del 5% (2/38) de las cepas fueron resistentes a colistina, presentando una concentración mínima inhibitoria de  $16 \mu\text{g/mL}$  (punto de corte:  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ). Además, se identificó la presencia de 1 a 5 plásmidos por cepa, con tamaños que oscilaron desde 14 kb a 437 kb, mientras su caracterización plasmídica mostró que el grupo de incompatibilidad más frecuente fue IncF, seguido de IncFIB e IncII, además de la presencia de ColE. De acuerdo con la clasificación por relaxasas la subfamilia más frecuente fue MOB-F12 y MOB-P51, mientras que los sistemas de adicción plasmídica más frecuentes fueron CcdA-CcdB, Hok-Sok y VagC-VagD. Igualmente, mediante el análisis de los resultados de secuenciación se identificaron elementos de la maquinaria de conjugación en plásmidos de las cepas C3302, C3321 y C3327. Mediante PCR se identificó que el 60% (23/38) de las cepas presentan tanto IS26 como ISEcp1, el 16% (6/38) IS26, y otro 16% ISEcp1, además de que más del 50% de las cepas secuenciadas presentaron transposones de la familia Tn3. Los hallazgos de este estudio demuestran que alimentos cárnicos de cerdo y pollo son reservorios potenciales de cepas de *E. coli* MDR que albergan elementos genéticos móviles que pueden promover la diseminación de la resistencia a otras cepas o especies bacterianas incluso de diferentes orígenes, lo cual sugiere la necesidad de implementar un monitoreo constante de las cepas aisladas de alimentos y de sus características moleculares.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*; México; resistencia antimicrobiana; alimentos cárnicos; plásmidos.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son el conjunto de enfermedades causadas por la ingesta de alimentos y/o agua que contienen agentes etiológicos en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (Aldaz & Álvarez, 2020). El consumo de alimentos contaminados es considerado un problema emergente a nivel mundial. Los patógenos transmitidos por alimentos son causa de enfermedades severas, hospitalización y muertes con repercusiones económicas y sociales (Madoroba *et al.*, 2022), siendo de particular interés microorganismos como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia* y *E. coli*, por su relevancia en brotes alimentarios, así como sus implicaciones clínicas (Ray *et al.*, 2022).

### 1.2 *Escherichia coli*

*E. coli* es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales (OMS, 2018). Actualmente, se han identificado 171 antígenos somáticos (O), 55 flagelares (H) y 80 capsulares (K) (Sarowska *et al.*, 2019) y se pueden clasificar en los grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F, G y clados crípticos (Alonso, 2018; Clermont *et al.*, 2019). Frecuentemente, las cepas de *E. coli* patógenas responsables de las infecciones pertenecen a los grupos filogenéticos B2 o D. El grupo E está relacionado filogenéticamente con el grupo D (incluido O157: H7), mientras que el grupo F es relacionado con el grupo B2 y el grupo G es el más recientemente descrito (Clermont *et al.*, 2019; Sarowska *et al.*, 2019).

Las cepas de *E. coli* patógenas son más frecuentes que cualquier otro miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, y han sido caracterizadas de acuerdo con su sitio de infección y a sus manifestaciones clínicas como *E. coli* patógena intestinal (IPEC) o *E. coli* diarreogénica (DEC) y *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) (Geurtsen *et al.*, 2022).

Las cepas DEC causan diferentes síndromes diarreicos y presentan diferencias específicas respecto a los factores de virulencia, la patogenia y la epidemiología de la infección (Molina *et al.*, 2021). Estas cepas son clasificadas en función de sus características y factores de virulencia codificados por genes como: *elt* y *est* caracterizados en *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *bae* y *bfpA* presentes en *E. coli* enteropatógena (EPEC), *ipaH* en cepas *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *pAA*, *aggR*, y *AAFs* en aislados de *E. coli* enteroagregativa (EAEC),

*Afa/Dr* que codifican para adhesinas en *E. coli* adherente difusa (DAEC), *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* y *bfp* presentes en *E. coli* productora de toxina Shiga o enterohemorrágica (STEC/EHEC) y *E. coli* adherente invasiva (AIEC) que no cuenta con un marcador genético para su identificación (De La Rosa-Hernández *et al.*, 2018; Mare *et al.*, 2021).

El grupo ExPEC incluye a: *E. coli* uropatógena (UPEC) la cual es asociada a infecciones del tracto urinario, cistitis, pielonefritis y prostatitis; *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC) con un riesgo potencial en recién nacidos; *E. coli* asociada a sepsis (SEPEC) o bacteriemia; y *E. coli* patógena aviar (APEC) específicamente en aves de corral (Geurtsen *et al.*, 2022). Los factores de virulencia de cepas ExPEC son numerosos y tienen una amplia gama de actividades, que incluyen adhesinas, toxinas, factores de adquisición de hierro, lipopolisacáridos, cápsulas de polisacáridos e invasinas, que generalmente se codifican en islas de patogenicidad, plásmidos y otros elementos genéticos móviles (Sarowska *et al.*, 2019).

### **1.3 *E. coli* en alimentos**

El patotipo de *E. coli* más frecuentemente asociados a alimentos de origen animal es STEC O157:H7; sin embargo, también algunos serotipos de STEC no O157 han sido identificados como causantes de infecciones transmitidas por alimentos en todo el mundo (Fayemi *et al.*, 2021; Lange *et al.*, 2022). Otros serotipos considerados como problema de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) son O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 y O145:NM, los cuales pertenecen a cepas que presentan un gran potencial para causar diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés) con afectaciones severas como anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda (Jure *et al.*, 2015; Alarcón *et al.*, 2020). Aunado a esto, debido a la amplia gama de alimentos por los que los microorganismos son transmitidos, es complicado atribuir todas las enfermedades a alimentos específicos, con excepción de los brotes, los cuales brindan datos más completos para determinar alimentos responsables de ciertas enfermedades (Omer *et al.*, 2018).

Los brotes de enfermedades transmitidas por alimento han sido asociados con frecuencia al consumo de carne poco cocida o picada, siendo esta última la vía más común en los brotes por *E. coli* O157:H7 (Wang *et al.*, 2017; Fayemi *et al.*, 2021). Dentro de los principales

reservorios señalados se reconocen a los rumiantes (especialmente ganado bovino), aunque también han sido identificados cepas en cerdos, aves como pollo y pavo (carne molida), animales salvajes, mariscos, verduras de hoja, entre otros (Escalona, 2014; Cernicchiaro, 2016; Wang *et al.*, 2017; Alarcón *et al.*, 2020).

La contaminación bacteriana y diseminación de cepas patógenas en la carne se ha presentado por la deposición de heces de animales, transporte de los animales al mercado, fallas ocurridas durante el proceso de sacrificio y/o caza, superficies de contacto y manipulación de los trabajadores minoristas o por el consumidor (Escalona, 2014; Rega *et al.*, 2021; Madoroba *et al.*, 2022), dando lugar a la transmisión de enfermedades por medio de contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, por contacto directo del hombre con animales, contacto persona a persona o por la ruta fecal-oral (Cernicchiaro, 2016), e incluso indirectamente, el clima puede influir en la transmisión de enfermedades transmitidas por los alimentos, ya que el ganado estresado por la temperatura puede ser más susceptible a la colonización por patógenos entéricos como *E. coli*, aumentando la probabilidad de que albergue mayores cantidades de estas bacterias, lo cual conduce a un mayor riesgo de contaminación de la carne durante el sacrificio (Smith *et al.*, 2019). El comercio internacional de alimentos y animales, pueden llevar a la introducción de cepas que modifican la epidemiología tradicional de *E. coli* patógenas y desafían los protocolos de bioseguridad y vigilancia (Galarce *et al.*, 2021).

Particularmente el patotipo STEC usa como biomarcador los genes de la toxina Shiga (*stx1* y *stx2*), los cuales son adquiridos típicamente por un bacteriófago lambdaoide (Torti *et al.*, 2021). Tanto *stx1* como *stx2* pueden causar SHU; sin embargo, *stx2* ha sido relacionada con mayor frecuencia con enfermedades graves (Galarce *et al.*, 2021; Torti *et al.*, 2021). Si bien el serotipo O157:H7 es el más prevalente y responsable de enfermedades más graves, más de 400 serotipos de *E. coli* pueden producir toxina Shiga (Bonino *et al.*, 2023).

#### **1.4 Resistencia a los antibióticos**

La propagación de resistencia a antibióticos se considera un riesgo crucial para la salud pública, además se encuentra relacionada tanto con microorganismos patógenos como comensales (Rega *et al.*, 2021). Junto con diversos patógenos, en los últimos años, nuevos vehículos alimentarios y patógenos zoonóticos emergentes se han vuelto cada vez más

resistentes a los agentes antimicrobianos (Omer *et al.*, 2018). Esta resistencia a los antibióticos puede ser transferida a través de bacterias resistentes por medio de la cadena alimentaria, directamente del ganado al productor, así como de los alimentos a humanos (Darphorn *et al.*, 2021; Rega *et al.*, 2021). Sin embargo, las altas tasas de resistencia se han atribuido al inadecuado uso de antibióticos en las prácticas agrícolas, así como en la alimentación animal y producción ganadera (Fayemi *et al.*, 2021), lo cual ha asociado diferentes riesgos, que van desde la resistencia a antibióticos en varias especies de animales que se crían para producir alimentos, hasta la resistencia a antibióticos en alimentos vendidos al por menor y destinados directamente al consumo humano (Madec & Haenni, 2018).

Los antimicrobianos utilizados en animales destinados al consumo humano representan más del 70 % de los producidos en todo el mundo. Su uso varía desde el tratamiento de enfermedades, control y medidas profilácticas, hasta su utilización por su efecto en la mejora del crecimiento (Vega *et al.*, 2020; Rega *et al.*, 2021). En los sistemas de crianza de cerdos, algunos antibióticos son utilizados para prevenir la propagación de enfermedades y la pérdida de animales, haciéndolos a su vez, un reservorio importante de bacterias portadoras de genes de resistencia (Zingali *et al.*, 2020), propagándose a través de la cadena alimentaria, siendo la carne cruda y productos cárnicos fuentes comunes de esta propagación (Darphorn *et al.*, 2021; Rega *et al.*, 2021).

Dentro de las tasas de resistencia antimicrobiana identificadas en *E. coli* se encuentran grupos de antibióticos de uso común, como quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos,  $\beta$ -lactámicos (como las cefalosporinas), sulfonamidas, fluoroquinolonas y tetraciclinas, compartidos entre humanos y animales en intestinos humanos, de pollos, de cerdos y de ganado (Ranjbar *et al.*, 2017; Quino *et al.*, 2020; Zalewska *et al.*, 2024a) sin embargo, también se ha reportado resistencia a antimicrobianos de último recurso terapéutico como fosfomicina, o la colistina a pesar de sus efectos nefrotóxicos y neurotóxicos.

#### **1.4.1 Resistencia a fosfomicina**

La fosfomicina interfiere en la biosíntesis de la pared celular al inhibir la enzima MurA, que participa en la síntesis de peptidoglucano, exhibiendo una actividad bactericida de amplio espectro frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, por lo que figura como una de las primeras opciones para el tratamiento de infecciones no graves del tracto urinario inferior

causadas por *E. coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Huang *et al.*, 2020). Actualmente, se han descrito distintos mecanismos de resistencia entre los que se destacan tres principales: el primero son las mutaciones en los genes *glpT* y *uhpA/T* los cuales codifican proteínas involucradas en el sistema de captación de fosfomicina por lo que impide su llegada al sitio de acción, siendo el transportador GlpT altamente conservado en bacterias como *Escherichia* (Mattioni *et al.*, 2023); otro de los mecanismos es la mutación del gen *murA* que afectan a la estructura de MurA evitando que la fosfomicina actúe como sustrato, mientras que el último mecanismo consiste en la adquisición de enzimas modificadoras de fosfomicina como las metaloenzimas FosA, FosB y FosX, o las quinasas FomA y FomB, siendo la incorporación de *fosA* en plásmidos y su diseminación en *E. coli* la responsable del aumento en los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) a este antibiótico. (Poirel *et al.*, 2018; Díez & Cantón, 2019). Hasta ahora se han identificado diez variantes de genes *fosA*, de los cuales *fosA2* y *fosA7* se han identificado cromosómicamente, mientras el resto son de localización plasmídica (Mattioni *et al.*, 2023), siendo *fosA3*, la variante más extendida en *E. coli*, y se ha detectado tanto en aislados humanos como de animales, asociado muy particularmente a animales productores de alimentos (Huang *et al.*, 2020).

#### **1.4.2 Resistencia a colistina**

Por otro lado, la colistina es un antimicrobiano que se ha reintroducido para el tratamiento de infecciones en pacientes hospitalizados causadas por bacterias Gram-negativas resistentes a los carbapenémicos (Elbediwi *et al.*, 2019). Su mecanismo de acción se basa en la afectación de la integridad de las membranas externa e interna por medio de la interacción de la colistina con los fosfatos del lípido A, causando la desestabilización de la membrana y posteriormente la lisis celular (Martínez, 2018). Lamentablemente la eficacia clínica de la colistina se ha visto irrupida por la aparición de la familia de genes de resistencia mediados por plásmidos, los cuales comprende desde *mcr-1* hasta *mcr-10* (Ling *et al.*, 2020; Bastidas-Caldes *et al.*, 2023).

Epidemiológicamente, los genes *mcr* han sido identificados en aislados de *E. coli* en humanos y en varios alimentos de origen animal, incluidos carne de pollo, carne de cerdos y lechones, ganado vacuno, terneros y pavos, siendo detectados en una amplia gama de plásmidos tales como IncI2, IncHI2, IncX4, IncP, IncF e IncY (Poirel *et al.*, 2018; Elbediwi *et al.*, 2019).

En Latinoamérica han sido reportados los genes *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* y *mcr-9* en cepas aisladas de alimentos de origen animal. La facilidad con la que los genes *mcr* se transfieren horizontalmente ha propiciado a una severa diseminación a nivel mundial, dando como resultado una gran variedad de especies bacterianas que cada vez muestran una mayor tolerancia a la colistina (Ling *et al.*, 2020). Actualmente, se ha mostrado un interés mayor en el estudio de resistencia a otros antibióticos prescritos en la práctica general; sin embargo, debido al uso excesivo y mal uso de este antibiótico entre humanos y animales, la resistencia a colistina está en aumento (Galindo-Méndez *et al.*, 2023).

### **1.5 Elementos genéticos móviles**

Actualmente, el papel que juegan los elementos genéticos móviles (EGM) en la diseminación de genes de resistencia y virulencia es bastante estudiado. Cepas de *E. coli* pueden albergar factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos en los mismos EGM, facilitando su diseminación entre distintas especies, incluyendo a cepas comensales que pueden promover la evolución de dicha resistencia y eventualmente actúan como reservorio de genes de virulencia en diferentes ecosistemas, otorgando una alta prevalencia de genes de resistencia entre los patógenos zoonóticos transmitidos por los alimentos (Markland *et al.*, 2015; Mir & Kudva, 2018; Carvalho *et al.*, 2021), conduciendo a fracasos terapéuticos tanto en la medicina humana como veterinaria (Zalewska *et al.*, 2024b).

El número de reportes sobre aislamientos de *E. coli* multidrogoresistente (MDR) ha aumentado durante las últimas décadas, y describen que muchos de los genes de resistencia a antibióticos, se adquieren mediante transferencia horizontal de genes (THG), permitiendo a las bacterias adaptarse a condiciones ambientales desfavorables mediante la adquisición de secciones de ADN que codifican características de virulencia (Zalewska *et al.*, 2024a).

Los EGM mayormente asociados a esta transferencia son plásmidos, integrones, secuencias de inserción (IS, por sus siglas en inglés) o transposones (Madec & Haenni, 2018; Geurtsen *et al.*, 2022).

Los plásmidos junto con los transposones, son capaces de moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma bacteriano, confiriendo un fenotipo de mayor resistencia a diversos antibióticos, mientras que los elementos transponibles más sencillos son las IS,

segmentos cortos de ADN y que únicamente contienen los genes necesarios para su propia transposición (Blanco, 2019; Galarce *et al.*, 2020).

### **1.5.1 Plásmidos**

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico generalmente circular que se replican de manera autónoma y se transmiten independientemente del ADN cromosómico (Rozwandowicz *et al.*, 2018; Balbuena-Alonso *et al.*, 2022). Los genes ubicados en plásmidos pueden adquirirse de diversos nichos y diseminarse mediante la THG (Wang *et al.*, 2015).

Algunos plásmidos contienen genes esenciales para la THG, incluidos los de replicación y conjugación, siendo esta última la principal vía de THG en las comunidades bacterianas (Liu *et al.*, 2020). Además, estos elementos poseen genes que pueden codificar sistemas para mejorar la transmisión, la supervivencia e incluso genes "accesorios" que enriquecen el nicho ecológico del hospedador al permitir la degradación de sustancias tóxicas y asegurar su permanencia (Zalewska *et al.*, 2024a).

La resistencia a los antibióticos está indudablemente asociada a plásmidos con la capacidad de capturar y ensamblar una amplia variedad de genes de resistencia a antibióticos, los cuales se propagan rápidamente a través de la conjugación (Zingali *et al.*, 2020; Zalewska *et al.*, 2024b). Es por ello, que los plásmidos conjugativos son reservorios potenciales de genes que diseminan resistencia entre bacterias (Singh *et al.*, 2021).

Los hallazgos sobre el contenido de genes de resistencia en plásmidos son particularmente alarmantes, ya que estos plásmidos pueden transferirse entre diferentes especies bacterianas, otorgándoles la capacidad de adquirir genes nuevos mediante otros EGM como transposones o secuencias de inserción, convirtiéndolos en vectores que aumentan la propagación de dichos genes (Thapa *et al.*, 2020; Zalewska *et al.*, 2024a).

La caracterización molecular de los plásmidos ayuda a entender la propagación de los genes que contribuyen a la resistencia a antibióticos, ya sea desde el aspecto epidemiológico en diferentes hospedadores o por la propagación epidemiológica de clonas bacterianas (Thapa *et al.*, 2020)

### **1.5.1.1 Caracterización plasmídica por PBRT**

Los plásmidos que confieren resistencia a múltiples fármacos poseen un tamaño relativamente grande (>50 kb), además, suelen ser autoconjugativos y codificar mecanismos que controlan su número de copias, regulando así su tasa de replicación; este control estricto implica que dos plásmidos que comparten el mismo replicón no pueden propagarse de forma estable en la misma bacteria, dando así el fenómeno denominado “incompatibilidad plasmídica”, característica que ha sido utilizada para clasificar los plásmidos en diferentes grupos. Los plásmidos con los mismos sistemas de control son incompatibles, mientras que los plásmidos con diferentes controles son compatibles entre sí (Carattoli *et al.*, 2013).

Carattoli y colaboradores (Carattoli *et al.*, 2005) desarrollaron el sistema de tipificación de replicones basado en PCR denominada PBRT, por sus siglas en inglés (PCR-Based Replicon Typing), el cuál es un esquema basado en el conjunto de cebadores con diferentes sitios blancos; genes *rep*, iterones y ARNi (Rozwandowicz *et al.*, 2018).

Carattoli se centró en el rastreo de plásmidos que portan genes de resistencia desde un aspecto epidemiológico, los cuales se han detectado entre *Enterobacteriaceae* en diferentes países, diferentes orígenes y fuentes (Carattoli *et al.*, 2005).

El enfoque multidisciplinario se ha aplicado para estudiar la adquisición y propagación de la resistencia a antibióticos en cepas bacterianas con relevancia clínica, estableciendo una clara vigilancia que puede estudiarse mediante la tipificación de replicones de plásmidos (Carattoli *et al.*, 2011).

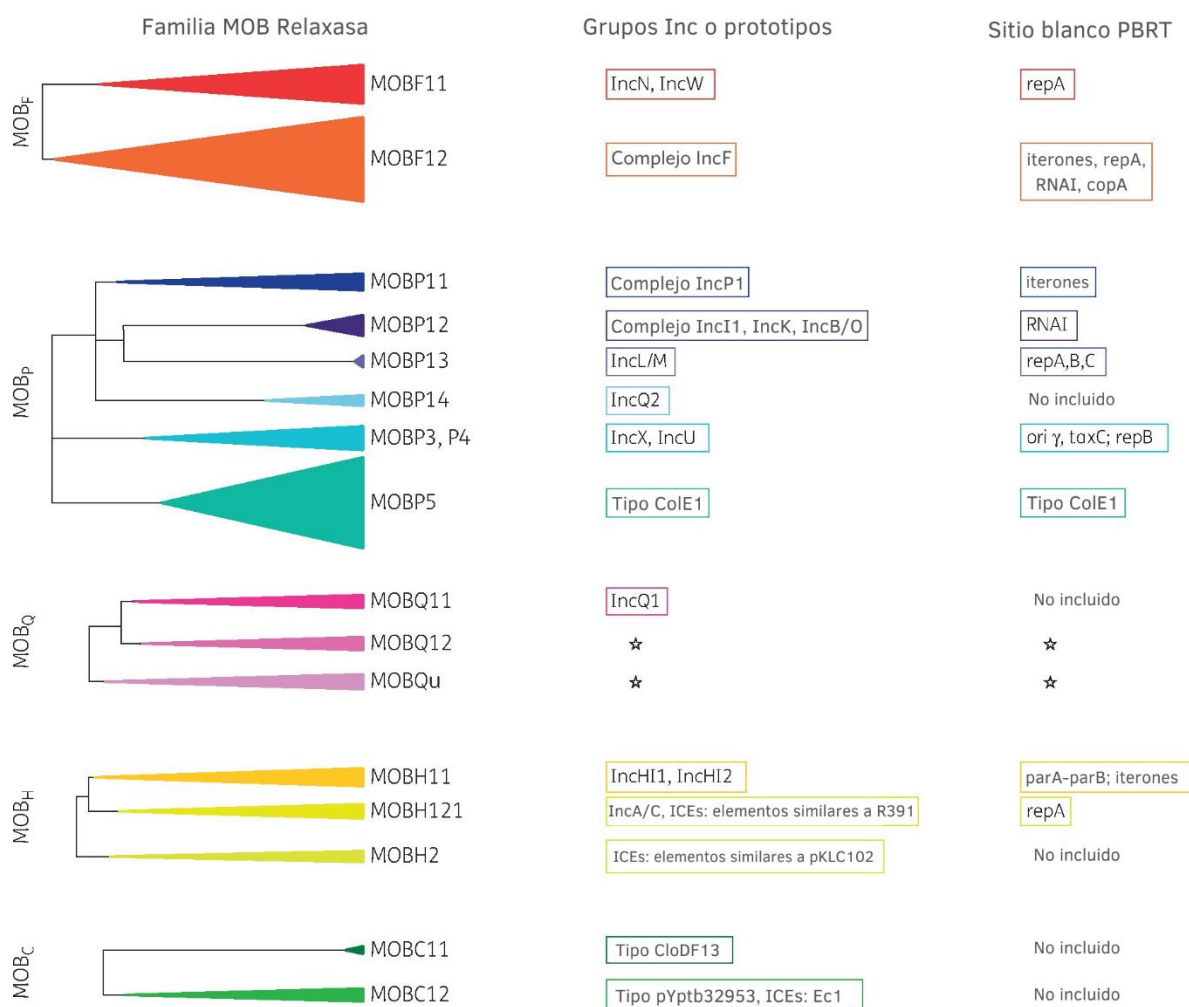
### **1.5.1.2 Caracterización plasmídica por relaxasas**

Un esquema alternativo para la tipificación de plásmidos es mediante los genes *mob* que codifican relaxasas, las cuales son componentes importantes tanto para plásmidos conjugativos como movilizables (Rozwandowicz *et al.*, 2018). Sin embargo, una limitación de esta clasificación es que no detecta plásmidos que no contienen un gen de relaxasa.

Alvarado y colaboradores (Alvarado *et al.*, 2012) desarrollaron el método de detección de relaxasa, llamado tipificación de cebadores degenerados MOB denominado DPMT por sus siglas en inglés (Degenerate primer MOB typing). Este esquema permite rastrear las

relaciones evolutivas entre las secuencias de relaxasa distribuyendo los plásmidos transmisibles en seis familias de relaxasa MOB.

De acuerdo con la caracterización plasmídica por relaxasas, existe una correlación con el esquema PBRT, la cual muestra que los plásmidos de cada tipo Inc tienen relaxasas pertenecientes a alguna subfamilia MOB (figura 1) (Rozwandowicz *et al.*, 2018).



**Figura 1. Distribución de plásmidos de la familia Inc según el tipo de relaxasa.** Tomado de Rozwandowicz *et al.*, 2018.

### 1.5.1.3 Sistemas de adicción de los plásmidos

Los plásmidos exitosos poseen gran versatilidad a la adaptación intracelular por la presencia de los sistemas de adicción que promueven el mantenimiento del plásmido durante la transmisión vertical en las células hijas (Carattoli *et al.*, 2011). Estos sistemas están basados generalmente en factores toxina-antitoxina que pueden matar células hijas que no heredan el

plásmido durante la división celular; la antitoxina por lo general precede al gen de la toxina, ubicada río arriba, teniendo así, el beneficio de su producción sobre la toxina (Carattoli *et al.*, 2013).

Factores genéticos intrínsecos como los módulos toxina-antitoxina (TA), tienen una participación significativa en la persistencia bacteriana. Los módulos TA se conforman por una parte de toxina asociada con una parte de antitoxina y pueden estar codificados cromosómicamente o extra cromosómicamente. Aquellos codificados extracromosómicamente pertenecen a la estabilización de plásmidos y la viabilidad celular (Singh *et al.*, 2021).

Los sistemas TA se han reportado en plásmidos de virulencia de bacterias patógenas para su estabilización, identificándose de forma abundante en los propios organismos patógenos. Los sistemas PemK-I, CcdB-A, VagD-C, Hok-Sok y SrnB-C son los sistemas TA identificados con mayor frecuencia en *E. coli* productora de BLEE, lo cual sugiere su contribución al mantenimiento del plásmido (Sonika *et al.*, 2023).

### **1.5.2 Secuencias de Inserción**

Las secuencias de inserción (IS), son una clase de elementos transponibles simples en genomas bacterianos con un papel importante en la variación de la evolución, su tamaño es pequeño (de ~0,7 a ~2,5 Kpb), y tanto su presencia como su actividad afectan la estructura del genoma y la expresión génica, afectando la capacidad del organismo (Lee *et al.*, 2016; Consuegra *et al.*, 2021). Pueden encontrarse en diferente rango de números de copias en un solo genoma y pueden moverse dentro de este mismo u horizontalmente entre genomas como parte de otros EGM como los plásmidos (Vandecraen *et al.*, 2017).

La mayoría de IS duplican una pequeña cantidad de pares de bases en su sitio de inserción de modo que una inserción está flanqueada por repeticiones directas cortas, además, la pérdida de IS es rara (Lee *et al.*, 2016), produciendo mutaciones que mejoran la adaptación en diversas condiciones ambientales, otorgando efectos beneficiosos que pueden ser suficientes para sostener, o al menos contribuir a la persistencia de la IS (Consuegra *et al.*, 2021).

La secuencia IS26, es frecuentemente reportada en aislamientos clínicos de bacterias Gram-negativas, siendo identificada tanto en cromosomas como en plásmidos, su importancia radica en su capacidad para secuestrar genes de resistencia a antibióticos y generar matrices de estos genes en plásmidos conjugativos clínicamente importantes, así como otros reordenamientos de plásmidos (Varani *et al.*, 2021). Se ha documentado que tanto IS26 como ISEcp1, en asociación con integrones de clase 1, son elementos frecuentemente implicados en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos y han sido asociados con los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, que confieren resistencia a cefalosporinas en cepas de *E. coli* (Vandecraen *et al.*, 2017; Pérez-Etayo *et al.*, 2018).

Particularmente ISEcp1, también juega un papel importante en la propagación de *bla*<sub>CMY-2</sub>, proporcionando un mecanismo de supervivencia adaptativo y alternativo para las bacterias, especialmente en altas concentraciones de cefalosporinas y facilitando la propagación de dicho gen (Fang *et al.*, 2018).

### **1.5.3 Transposones**

Los transposones son elementos genéticos que se definen como una secuencia de ADN capaz de saltar a diferentes lugares del genoma; por esta razón, han sido denominados como genes saltarines (Babakhani & Oloomi, 2018). Debido a su plasticidad genómica, han contribuido a la capacidad de las bacterias para sobrevivir en diversos entornos, jugando un papel importante en la diversidad y evolución genómica, son capaces de proporcionar resistencia a los antibióticos, además de que existe la posibilidad de que los transposones puedan saltar del ADN cromosómico al ADN plasmídico y viceversa contribuyendo al desarrollo y diseminación de resistencia (Sultan *et al.*, 2018).

## 2. ANTEDECENTES

### 2.1 GENERALES

En los últimos 20 años se ha registrado un aumento global de *E. coli* productoras de BLEE y  $\beta$ -lactamasas AmpC (Rega *et al.*, 2021).

Un análisis realizado de 2002 a 2012 en Canadá, expuso los datos de muestras aisladas de carne de res, pollo y cerdo de granjas, mataderos y establecimientos minoristas, en las cuales, la venta al por menor de carne de res y cerdo, mostró la presencia de *E. coli* como un dato significativo respecto a la relación que posee entre el clima y la contaminación de productos cárnicos (Smith *et al.*, 2019).

Un estudio entre junio del 2009 y enero del 2011 en Lima, Perú demostró que el 87.18% de las muestras de carne molida que se expende en Lima se encontraban contaminadas con *E. coli*, y de estas un 1.54% pertenecían al serotipo O157:H7, lo cual fue considerado como inaceptable para el consumo humano, poniendo en evidencia las deficientes condiciones higiénicas en las que se había procesado el alimento (Méndez *et al.*, 2013).

En 2014, 13 estados de Estados Unidos notificaron 39 brotes señalando a STEC como agente causal, aunque los brotes involucraron hospitalizaciones, los productos cárnicos no fueron relacionados con los brotes aun cuando fueron respaldados por pruebas sólidas (Omer *et al.*, 2018).

En Noruega, 2015, se realizó un estudio comparativo de aislados de *E. coli* procedentes de muestras clínicas con respecto a muestras de carne y productos cárnicos. Determinaron la presencia de integrones de clase 1 y 2, demostrando una diferencia significativa, encontrándolos con más frecuencia entre aislados humanos (45.4%) que entre aislados de carne (18%). En los integrones se identificaron genes de resistencia a aminoglucósidos y trimetoprim (Sunde *et al.*, 2015).

En 2017 un estudio evaluó la prevalencia de STEC en carnes y derivados cárnicos. Con un total de 170 muestras recibidas en el Servicio de Bromatología y Seguridad Alimentaria, del Centro Militar de Veterinaria, España, detectaron una prevalencia de STEC del 19.41 %. Los preparados cárnicos tuvieron una prevalencia del 25.42 %, mientras que para los derivados de carne de caza fue de 27.4 % (Rípodas *et al.*, 2017).

En Ecuador, un estudio realizado entre el año 2017 y 2018, Alarcón y cols., recolectaron 200 muestras de carne molida y productos cárnicos de tres mercados ubicados en distintas zonas de la ciudad de Guayaquil. Los resultados mostraron la presencia de *E. coli* en un 46.5% del total de muestras, siendo conteos superiores a los permitidos por la norma INEM 1346:2016, lo cual evidenciaba deficientes prácticas de higiene en el procesamiento del alimento, además, de acuerdo con la serología un 3.2% dieron positivas para *E. coli* O157:H7 (Alarcón *et al.*, 2020).

Un estudio realizado en la ciudad de Pamplona, Colombia en 2019, analizó 100 muestras de *E. coli* aisladas de carne cruda de bovino, de las cuales, el 39% contenían el gen *stx2*, mientras que el 38% poseían tanto los genes *stx1* y *stx2*. Identificaron al patotipo STEC en el 13% de las muestras analizadas, aunque, no fue detectada la presencia del serogrupo O157. Las cepas aisladas demostraron resistencia frente a algunos antibióticos de primera y segunda generación como: penicilinas (ampicilina, piperaciclina y ticarcilina), inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico) y cefalosporinas (cefuroxima y cefalotina) (Herrera *et al.*, 2019).

En 2020 en Brasil fue realizado un estudio donde caracterizaron la patogenicidad y la resistencia antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de cortes crudos refrigerados de carne de pollo. El perfil de resistencia más alto se observó hacia  $\beta$ -lactámicos (39.5%), seguido de sulfametoxazol con trimetoprim (36.9%) y polimixina (33.4%). En general, el 36.3% fueron MDR y el 17.04% de las cepas se identificaron como productoras de BLEE (Crecencio *et al.*, 2020).

Darphorn y colaboradores en Países Bajos en 2021, publicaron el estudio realizado a cepas de *E. coli* aisladas de carne destinada al mercado de consumo, en el cual encontraron que la mayoría de las cepas contenían varios plásmidos de diferentes tamaños; dichos plásmidos presentaron los grupos de incompatibilidad IncI, IncX, IncF, IncB/O/K/Z, IncR, IncN y P0111, siendo los tres primeros los más comunes (Darphorn *et al.*, 2021). En el mismo año en Japón se realizó un análisis de muestras de carne, en el que examinaron 1183 aislamientos bacterianos, de los cuales cerca del 78% mostraron MDR a ampicilina, tetraciclina, kanamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, cefotaxima y cloranfenicol; además, el 22.1% de

los aislamientos de *E. coli* portaban genes que codificaban  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido y mostraron fenotipos productores de BLEE (Xedzro *et al.*, 2023).

En Iraq en 2023, fue publicado un estudio del análisis de un total de 100 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de productos cárnicos, en el que se detectó el patotipo ETEC en mayor porcentaje (46.32%), seguido de STEC, EHEC y EPEC con 20.05, 14.74 y 6.32 % respectivamente (Abdlla & Al-Sanjary, 2023).

Hasta el 2023, Argentina posee la tasa más alta de SUH a nivel mundial con el 70% de los casos asociados con infecciones por STEC, destacando serotipos O157:H7 y O145:H28 como los más comunes, y el genotipo *stx2a* mayormente asociado a diarrea sanguinolenta y SUH, mientras que *stx1a* se asocia en menor porcentaje. Las cepas de estudio aisladas tanto de pacientes como de animales de consumo, presentaron MDR a aminoglucósidos, trimetoprim, tetraciclinas, penicilinas, quinolonas y presuntamente a colistina (Carbonari *et al.*, 2022; Rivas *et al.*, 2023)

En Latinoamérica, se registran al menos 77 millones de personas que se enferman cada año por consumir alimentos contaminados, de este grupo llegan a morir hasta 9.000 al año; así como de 10-17 casos por cada 100,000 niños menores a 5 años manifiestan colitis hemorrágica o infección esporádica por *E. coli* productora de enterotoxina (Aldaz & Álvarez, 2020).

En México:

En el estado de Tamaulipas, un análisis de muestras de carne recolectadas de supermercados y tiendas minoristas (carnicerías) entre agosto de 2013 y marzo de 2014, encontró un total de 158 aislamientos de *E. coli*, de los cuales 1.9% albergaban el gen de virulencia *stx1*, 17.7% albergaban *stx2* y 21.5% albergaban *hlyA*; además, observaron una alta resistencia fenotípica en casi todos los aislamientos, ya que el 92.4 % de las cepas aisladas fueron multirresistentes con resistencia a cefalotina, ampicilina, cefotaxima, nitrofurantoína y tetraciclina (Martínez-Vázquez *et al.*, 2018).

En el estado de México, un estudio publicado en 2015, reportó haber recolectado un total de 1695 muestras de diferentes lugares a lo largo de las etapas de producción y procesamiento de la carne de res (muestras de los canales después del desollado, antes de la evisceración,

antes del enfriamiento, antes de entrar en la caja caliente y 24 horas después del enfriamiento en seco en los enfriadores) en un corral de engorde y en una planta de sacrificio certificada por el tipo de inspección federal en México. Recuperaron un total de 97 cepas de *E. coli* O157, de las cuales 91.72% portaban los genes *stx2*, *eae* y *ehxA* (Narvaez-Bravo *et al.*, 2015).

En 2016, un estudio en el Valle agrícola de Culiacán, al noroeste de México, reportó el aislamiento de un total de 59 cepas STEC O157:H7 y no O157 provenientes de bovinos, ovinos y pollos. Dichas cepas presentaron resistencia a las clases de antimicrobianos comúnmente utilizados en México (aminoglucósidos, tetraciclinas, cefalosporinas y penicilina); sin embargo, consideraron como un trabajo futuro, la investigación detallada de elementos genéticos que contribuyen a la adquisición y diseminación de los genes de resistencia a los antimicrobianos en las cepas de STEC, resaltando la necesidad de una vigilancia de resistencia a los antimicrobianos en una importante región agrícola (Amézquita-López *et al.*, 2016).

En 2020, Vega y colaboradores aislaron 32 cepas de muestras colectadas de bovinos en tres rastros municipales del centro de México, de las cuales el 75 % presentaron resistencia a algún antibiótico, y el 28.1 % fueron multidrogosresistentes (MDR) (Vega *et al.*, 2020).

## **2.2 ANTECEDENTES DIRECTOS**

En 2018, Barrios y colaboradores publicaron un estudio de aislados de *E. coli* productoras de BLEE y  $\beta$ -lactamasas AmpC aisladas de muestras de alimentos de origen animal en Puebla, México. Caracterizaron las  $\beta$ -lactamasas, linajes genéticos, genes de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos y genes de virulencia de los aislados recuperados. Con un total de 46 muestras (36 de pollo y 10 de cerdo), 24 de las muestras produjeron BLEE o CMY-2. En total, 12 de 16 aislamientos (75%) productores de BLEE portaban integrones de clase 1 con genes de resistencia a trimetoprim (*dfrA*) y aminoglucósidos (*aadA*); mientras que 4 aislamientos (25%) portaban integrones de clase 2 con genes de resistencia a cloranfenicol (*cmlA*), sulfonamidas (*sul3*) y aminoglucósidos (*aadA*). Además, se determinó la resistencia a otras familias de antibióticos no asociados a  $\beta$ -lactámicos, tales como: aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfonamidas, siendo los genes *sul3*, *tetA*, *tetB*, y *cmlA*, los mayormente encontrados. Las cepas no BLEE con fenotipo AmpC también

mostraron resistencia a aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfonamidas, portando en su mayoría los genes *qnrB10*, *qnrA1*, *tetA*, *tetB*, *cmlA* y *sul3*. En dichas cepas hallaron integrones de clase 1 con genes de resistencia a trimetoprim (*dfrA*) y aminoglucósidos (*aadA*), e integrones de clase 2 con genes de resistencia a cloranfenicol (*cmlA*), sulfonamidas (*sul3*), trimetoprim (*dfrA*) y aminoglucósidos (*aadA*) (Barrios-Villa *et al.*, 2018).

Adicionalmente en el presente año, Balbuena-Alonso y col, publicaron el análisis genómico de un conjunto de secuencias genómicas de *E. coli* disponibles en GenBank; los genomas analizados fueron obtenidos de cepas aisladas de alimentos y aislados clínicos, evidenciando una importancia significativa al mostrar los intercambios genéticos, facilitados por los plásmidos, entre cepas alimentarias y cepas clínicas. De un total de 1794 genomas de *E. coli*, el 4% pertenecían a muestras de comida, siendo un 66% de estas asociadas a cárnicos. Los plásmidos asociados a las cepas de origen alimentario fueron Col, IncB, IncO, IncK, IncZ, IncF, IncHIA, IncI1-I, IncY, IncHI1B, IncHI2A, IncR, IncC, IncX1 y p0111. Los genes de resistencia identificados según la familia de cada antibiótico fueron: aminoglucósidos [*acc(3)-IIa*, *aph(3'')-Ib*, *aadA1*, *aadA2*, *aph(6)-Id*, *aac(3)-IId*, *aph(3')-Ia*, *aadA22*, *aadA5*, *aph(3')-IIa*, *aac(3)-IIg*, *aac(3)-IV*, *aac(6')-IIc*, *aadA17*, *aadA24*, *aph(4)-Ia*, *aph(6)-Ic*], β-lactámicos (*bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, *bla*<sub>TEM-1A</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, *bla*<sub>HERA-3</sub>, *bla*<sub>LAP-2</sub>, *bla*<sub>NDM-5</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>TEM-135</sub>, *bla*<sub>TEM-214</sub>, *bla*<sub>TEM-215</sub>), fluoroquinolonas [*qnrS1*, *qnrB19*, *qnrA1*, *qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS11*], trimetoprim (*dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA1*, *dfrA17*, *dfrA5*), fenoles (*floR*, *cmlA1*, *cmlA5*), tetraciclina [*tet(A)*, *tet(M)*, *tet(B)*, *tet(X4)*], macrólidos (*mphA*), colistina (*mcr-1.1*, *mcr-9.1*) y sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*) (Balbuena-Alonso *et al.*, 2022).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso inadecuado de antibióticos de amplio espectro en animales destinados al consumo humano contribuye a la diseminación de clonas de *E. coli* multidrogorresistentes en el ámbito humano, veterinario y ambiental. El aumento actual de estas cepas ha agravado los problemas de salud y limitado las opciones terapéuticas que se consideraban eficaces como tratamientos de primera línea, dificultando cada vez más la posibilidad de establecer un control eficiente ante una problemática mundial. El problema de la multidrogorresistencia es facilitado en gran medida por elementos genéticos móviles (plásmidos, secuencias de inserción, transposones e integrones) que juegan un papel importante al facilitar la transferencia horizontal de genes y, por lo tanto, promover la adquisición y propagación de genes de resistencia.

La seguridad microbiológica de la carne y derivados de productos cárnicos es uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo. Las bacterias resistentes a antibióticos que se encuentran contaminando carne, pueden transferir genes de resistencia a otras bacterias, además de producir sus toxinas, lo que podría conducir a enfermedades más difíciles de tratar. Los animales pueden actuar como reservorios naturales de *E. coli* resistentes a antibióticos, transmitiéndolas a los humanos por contacto directo o a través de la cadena alimentaria.

Este trabajo proporciona información importante y epidemiológica para un país que cuenta con pocos estudios respecto al tema, pues, aunque *E. coli* es un microorganismo ampliamente estudiado, los aislados clínicos han tenido prioridad sobre los de origen alimentario.

A pesar de existir reportes de resistencia y susceptibilidad a antibióticos en cepas alimentarias, en lo general, se busca los patotipos STEC y EHEC; sin embargo, estos no profundizan sobre los mecanismos moleculares que proporcionan la MDR, ni caracterizan los elementos genéticos móviles que participan en la transferencia horizontal de estos genes.

Este trabajo contribuye a enfocar futuras perspectivas y una vigilancia epidemiológica más certera, con el objetivo de que las medidas de seguridad sanitaria establecidas se lleven a cabo con eficiencia y establecer mayor responsabilidad.

## **4. OBJETIVO**

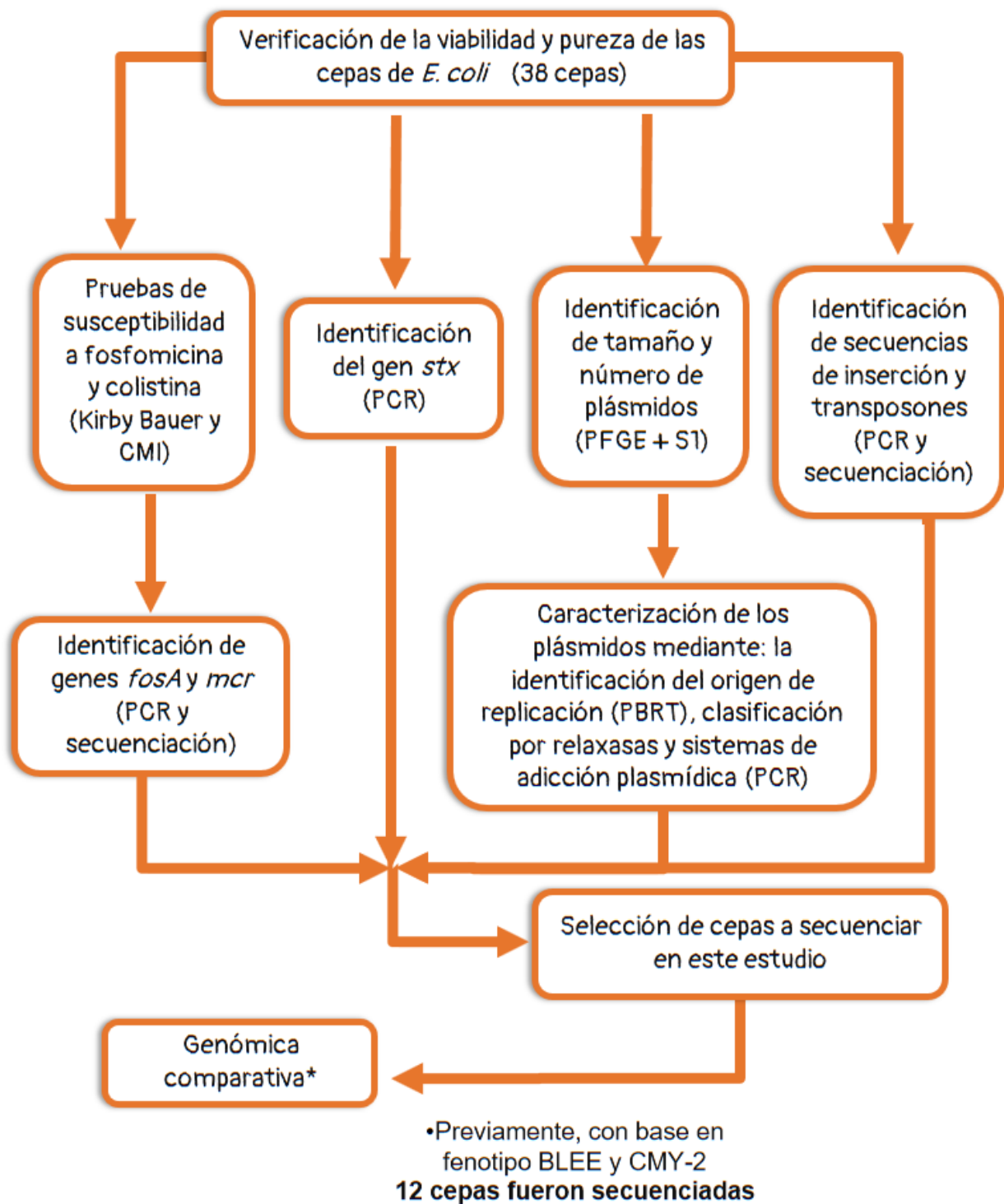
### **4.2 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar parcialmente los elementos genéticos móviles que acarrean genes de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos cárnicos.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Evaluar el perfil fenotípico de susceptibilidad a colistina y fosfomicina.
- II. Identificar los genes de resistencia hacia los antibióticos: colistina (*mcr*) y fosfomicina (*fosA*).
- III. Investigar la presencia del gen que codifica a la toxina shiga (*stx*).
- IV. Estimar el tamaño y número de plásmidos presentes en las cepas.
- V. Caracterizar parcialmente los plásmidos mediante: identificación de los sistemas de adicción plasmídica, clasificación por relaxasas y tipado por “PCR-based replicon typing” (PBRT).
- VI. Identificar la presencia de secuencias de inserción y transposones presentes en las cepas de interés.
- VII. Realizar un análisis bioinformático de 12 cepas de *E. coli* seleccionadas, mediante secuenciación del genoma completo.

## 5. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Viabilidad y pureza de cepas de *E. coli*

El laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad, cuenta con una colección de 38 cepas de *E. coli* productoras y no productoras de BLEE y  $\beta$ -lactamasas AmpC, aisladas por Sergio Romero Romero de muestras de alimentos de origen animal en Puebla, México (tabla 1). Se verificó la viabilidad y pureza de las cepas por medio de la inoculación en placas de agar TSA (BD Bioxon®) (Agar Soya Trypticaseina), agar MacConkey y agar EMB (Eosina y azul de metileno), analizando su crecimiento y morfología colonial 24 horas después de su inoculación e incubación a 37°C.

**Tabla 1. Nomenclatura y características de las cepas de *E. coli* productoras y no productoras de BLEE y  $\beta$ -lactamasas AmpC, aisladas de productos cárnicos.**

No. de Cepa	Origen	Producción de BLEE	Producción de $\beta$ -lactamasas AmpC (CMY-2)
C2336	Pollo	+	-
C2337	Pollo	+	-
C2338	Pollo	+	-
C2339	Cerdo	+	-
C3297	Pollo	+	-
C3298	Pollo	+	-
C3299	Pollo	-	-
C3300	Pollo	+	-
C3302	Cerdo	+	-
C3303	Pollo	-	-
C3304	Pollo	-	+
C3305	Pollo	-	+
C3306	Pollo	-	+
C3307	Pollo	-	-
C3308	Cerdo	-	-
C3309	Cerdo	-	+
C3310	Pollo	-	-
C3311	Pollo	-	+
C3312	Cerdo	-	-
C3313	Pollo	+	-
C3314	Pollo	+	-
C3315	Pollo	+	-
C3316	Cerdo	-	+
C3317	Pollo	+	-
C3318	Pollo	+	-

<b>C3319</b>	Pollo	+	-
<b>C3320</b>	Pollo	+	-
<b>C3321</b>	Pollo	-	+
<b>C3322</b>	Pollo	-	-
<b>C3323</b>	Pollo	-	-
<b>C3324</b>	Pollo	-	-
<b>C3325</b>	Pollo	-	+
<b>C3326</b>	Pollo	-	-
<b>C3327</b>	Pollo	+	-
<b>C3328</b>	Pollo	-	-
<b>C3329</b>	Pollo	+	-
<b>C3330</b>	Pollo	-	-
<b>C4424</b>	Pollo	-	-

## 6.2 Evaluación de susceptibilidad a colistina y fosfomicina

### 6.2.1 Perfil fenotípico de susceptibilidad a colistina y fosfomicina

La determinación del perfil de susceptibilidad a colistina y fosfomicina en las cepas de *E. coli*, se realizó por medio del método de difusión en disco, utilizando la técnica de Kirby-Baüer de acuerdo con los estándares establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024). Brevemente consistió en que, a partir de un cultivo puro de 24 horas, sembrado en agar TSA, se resuspendieron de 1 a 3 colonias aisladas en un tubo con 5 ml de solución salina isotónica (SSI) al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, hasta alcanzar una turbidez a 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). De esta suspensión se impregnó un hisopo de algodón estéril y se inocularon placas de agar Müller-Hinton (BD Bioxon®), empezando en la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 45° cada vez y pasándolo por último sobre el costado de la periferia de la placa para conseguir un crecimiento uniforme. Posteriormente, se colocaron los discos de antimicrobianos (fosfomicina/trometamol 200 µg; colistina 10 µg) y las placas se incubaron de 18 a 24 h a 37 °C. Finalmente, se midieron los halos de inhibición y los resultados se interpretaron de acuerdo con los valores establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024). La cepa de *E. coli* ATCC 25922 fue usada como control negativo.

Los genes de resistencia se identificaron mediante PCR y secuenciación (ver más adelante).

## 6.2.2 Determinación de concentración mínima inhibitoria a colistina y fosfomicina

La determinación de la concentración mínima inhibitoria para colistina y fosfomicina se realizó a las cepas con perfil fenotípico resistente o intermedio. Para ambos antibióticos se ocupó el método de dilución en agar.

### 6.2.2.1 Preparación de medio

En el método de dilución en agar, el antibiótico es incorporado en placas de agar Müeller-Hinton, considerando que cada placa contiene una concentración diferente del antibiótico de acuerdo al CLSI, 2024 (tabla 2).

**Tabla 2. Concentraciones de antibiótico empleadas para la determinación de CMI.**

Antibiótico	Concentraciones empleadas (µg/mL)
Colistina	1, 2, 4, 8, 16
Fosfomicina	32, 64, 128, 256, 512, 1024

(CLSI, 2024)

El stock de antibiótico se preparó a las concentraciones siguientes:

- Sulfato de colistina: 500 µg/mL

- Fosfomicina: 10 000 µg/mL

El agar Müeller-Hinton utilizado para la determinación de CMI de fosfomicina, se suplementó con glucosa 6-fosfato a una concentración de 25 µg/mL (CLSI, 2024).

Cada placa se dividió para triplicar cada inóculo; placa Petri de 60x15 mm con disponibilidad de 18 inóculos (6 cepas), placa Petri de 90x15 mm con disponibilidad de 42 inóculos (14 cepas).

### 6.2.2.2 Preparación de la muestra

A partir de un cultivo puro de 24 horas, sembrado en agar TSA, se resuspendieron de 1 a 3 colonias aisladas en un tubo con 5 ml de solución salina isotónica (SSI) al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, hasta alcanzar una turbidez igualada al tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml), posteriormente, de dicha suspensión se realizó una dilución 1:10 ( $1.5 \times 10^7$  UFC/ml) en microtubos, usando como diluyente SSI al 0.85%

### **6.2.2.3 Inoculación de placas**

A partir de la solución 1:10 de cada muestra, se tomaron 2  $\mu\text{L}$  y se depositaron en la sección disponible de cada placa Petri, la inoculación se realizó por triplicado, dejando secar cada inóculo antes de continuar con la siguiente muestra.

Las placas se incubaron 18 h a 37 °C. Los resultados se interpretaron de acuerdo con los valores establecidos por el CLSI, 2024: el punto de corte de resistencia para fosfomicina es  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ , y para colistina es  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  (CLSI, 2024). *E. coli* ATCC 25922 fue usada como control negativo para ambos antibióticos. *E. coli* C2-007 portadora del gen plasmídico *mcr-1* fue usada como control positivo para colistina.

## **6.3 Obtención de ADN bacteriano**

La extracción del material genético se realizó de acuerdo al uso que se le daría posteriormente al ADN, las diferentes metodologías se describen a continuación.

### **6.3.1 Extracción por método de hervido**

A partir de un cultivo puro de 24 h en medio TSA, se recolectó una asada bacteriana y se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de agua inyectable estéril en microtubos, se homogenizó con ayuda del vórtex. Posteriormente el tubo se colocó en baño María a temperatura de ebullición durante 15 min para lisar las células. Una vez transcurrido el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min para separar los restos celulares del material genético. Finalmente se recuperó el sobrenadante (que contiene el templado de ADN total) en nuevos microtubos estériles con cuidado de no llevarse restos de la pastilla del fondo; el material genético se conservó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.3.2 Extracción de ADN genómico**

La extracción del ADN genómico para secuenciación se realizó mediante el kit de extracción Promega Wizard™ Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las instrucciones del procedimiento proporcionado por el fabricante (ver anexo).

## **6.4 Cuantificación y pureza del ADN**

La concentración y pureza del ADN fue medida y ajustada a 100 ng/ $\mu\text{l}$  con la ayuda del equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) mediante la lectura de la muestra a 260 nm para determinar la concentración de ADN de doble cadena; la pureza del ADN se evaluó

determinando el cociente de las absorbancias 260/280 nm considerando como una buena pureza un valor de 1.7 a 2.0 y la integridad del ADN se evaluó por electroforesis corriendo una muestra de 0.5 µl de la extracción en un gel de agarosa al 0.7% y tiñendo el gel con Bromuro de Etidio (BET) (Bio-Rad) a una concentración de [0.4 µl/ml], para después tomar la fotografía en el fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro) y observar la integridad del ADN.

## 6.5 Identificación del gen *stx* y genes de resistencia

### 6.5.1 Determinación de la presencia del gen *stx*

La búsqueda del gen *stx*, se realizó mediante la técnica de PCR, utilizando la cepa *E. coli* EDL933 como control positivo. En la tabla 3 se encuentran los componentes y las concentraciones utilizadas de cada uno para realizar la PCR. Los oligonucleótidos específicos y condiciones para amplificar *stx1* y *stx2*, se muestran en la tabla 4.

**Tabla 3. Componentes de PCR y su concentración, utilizados para la determinación de genes *stx1* y *stx2*.**

Componentes	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Buffer 10X - MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	10X	1 µl	1X
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	10 mM	0.3 µl	0.3 mM
Oligonucleótido "Forward" (Sigma)	25 µM	0.3 µl	0.75 µM
Oligonucleótido "Reverse" (Sigma)	25 µM	0.3 µl	0.75 µM
BIOTAQTM DNA Polimerasa (Bioline)	5 U/µl	0.1 µl	0.5 U
Agua	-	7.5 µl	-
ADN	100 ng/µl	0.5 µl	-
<b>Volumen final de la reacción</b>		10 µl	

**Tabla 4. Oligonucleótidos y condiciones de PCR, usados para búsqueda del gen *stx*.**

Gen	Iniciadores (5' → 3')	Condiciones	Tamaño (pb)	Referencia
<i>stx1</i>	STX1-F: TTTACGATAGACTTCTCGAC STX1-R: CACATATAAATTATTTCGCTC	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 1 min 55°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min	227	Fratamico <i>et al.</i> , 1995.

		72°C 10 min. 1 ciclo		
<i>stx2</i>	stx2-F: GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC stx2-R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 20 seg. 60°C 45 seg. 35 ciclos 72°C 30 seg. 72°C 7min. 1 ciclo	255	Panchalingam <i>et al.</i> , 2012.

### 6.5.2 Genes de resistencia a colistina y fosfomicina

La búsqueda de los genes involucrados en la resistencia a colistina y fosfomicina de las cepas de *E. coli* se realizó mediante la técnica de PCR. Los oligonucleótidos específicos y condiciones para amplificar se muestran en la tabla 5 y 6. La búsqueda de *fosA1 – fosA10* se realizó con oligonucleótidos degenerados.

**Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones de PCR, usados para búsqueda del gen *mcr-1*.**

COLISTINA				
Gen	Iniciadores (5' → 3')	Condiciones	Tamaño (pb)	Referencia
<i>mcr-1</i>	mcrV1-2-F (Morv1-2-F): TATCGCTATGTGCTAAAGCCTG  mcrV1-2-R (Morv1-2-R): CATCAAACAGCTTWARYARTG	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 1 min 57°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	1393	Aguilar-Solorio y Bello-Lopez, 2018.

**Tabla 6. Oligonucleótidos y condiciones de PCR, usados para búsqueda de genes involucrados en la resistencia a fosfomicina.**

FOSFOMICINA				
Gen	Iniciadores (5' → 3')	Condiciones	Tamaño (pb)	Referencia
<i>fosA1 – fosA10</i>	F: CATCTGACSTSGCGGTCAG R: TGCAGYTCCAGYTTRTGSCC	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 30 seg 58°C 30 seg 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 10 min 1 ciclo	326	Freire <i>et al.</i> , 2023
<i>fosA7</i>	F: CTCTGAACCACTTAACGCT R: CTTTCCAGACCGTCACTCC	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 30 seg 53°C 30 seg 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 10 min 1 ciclo	270	Zhang <i>et al.</i> , 2022; Este estudio
<i>fosA3</i>	F: GCGTCAAGCCTGGCATT R: GCCGTCAAGGTCGAGAAA	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 30 seg 57.5°C 30 seg 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 10 min 1 ciclo	282	Güneri, <i>et al.</i> , 2022; Este estudio
<i>fosL</i>	F: GCCAAGCTAATTCAAAAAGGC R: ACACGACATTGCTTCAAGCG	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 30 seg	140	Freire <i>et al.</i> , 2023.

		58°C 30 seg 35 ciclos 72°C 1 min 72°C 10 min 1 ciclo		
--	--	--	--	--

## 6.6 Visualización de los productos de PCR

Para la visualización de los productos de PCR, se realizó una electroforesis de ADN, en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando un buffer TAE 1X a 90 Voltios durante 45-50 min. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific®) para poder identificar el tamaño del fragmento amplificado y se usó un buffer de carga para colocar las muestras en el gel. Posteriormente los geles se tiñeron con una solución acuosa de 200 ml de BET (Bio-Rad [0.4 µl/ml]), durante 5-10 seg y se lavaron con agua destilada durante una hora. Finalmente, los geles se visualizaron y digitalizaron con ayuda del fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro).

## 6.7 Caracterización plasmídica

### 6.7.1 Determinación del tamaño y número de plásmidos

Para determinar la cantidad y tamaño de los plásmidos en las cepas de trabajo se obtuvo el perfil plasmídico de las cepas mediante Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) con la enzima S1. La digestión enzimática del ADN se realizó con la enzima nucleasa S1, con el fin de generar una conformación lineal de los plásmidos y poder separarlos mediante PFGE. Una vez realizado el corrimiento se determinó el número de plásmidos contando el número de bandas observadas en el gel: se utilizó la cepa de referencia *E. coli* NCTC 50192 que contiene 4 plásmidos de tamaño conocido (156, 61, 40 y 7 kb).

#### 6.7.1.1 Preparación de insertos bacterianos

A partir de un cultivo puro crecido durante 24 h en agar BHI (BD Bioxon), se realizó una suspensión bacteriana en 3 ml de Buffer TE (ver anexo) hasta conseguir una absorbancia de 3.00 en la escala de McFarland ( $9 \times 10^8$  UFC/ml). Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarosa, BioRad®) al 1.5% en tampón TE y se mantuvo a 54°C; se mezclaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa y se distribuyó en moldes para obtener los insertos. Posteriormente se dejó solidificar 10-15 minutos en refrigeración.

### **6.7.1.2 Lisis bacteriana**

Se procedió a realizar la lisis bacteriana *in situ* para lo cual se emplearon 2 insertos por cepa. En microtubos se añadió 1 ml de Buffer de lisis (ver anexo) por inserto y se incubó durante 24 h en baño María a 54°C.

### **6.7.1.3 Lavado de los insertos**

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

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

Después de cada lavado, una vez fuera del baño María, se dejó 10 min en hielo y posteriormente se decantó.

Los insertos se conservaron en 1 ml de Buffer TE a 4°C hasta su utilización.

### **6.7.1.4 Digestión enzimática**

Medio inserto de cada cepa se digirió con la enzima S1. El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µl por tubo, a los que se añadieron 160 U/µl de enzima S1 (Fermentans Thermo Scientific®), 20 µl de Buffer 5X de la enzima y 78.4 µl de agua inyectable estéril. Se incubó por 40 min a temperatura ambiente.

Reacción: Enzima S1 (160 U/ µl): 1.6 µl

Buffer 5X: 20 µl

Agua: 78.4 µl

Vol. Final: 100 µl

Transcurrido los 40 min de incubación, la digestión se detuvo colocando el inserto en un microtubo con 150 µl de EDTA a 0.5M y 1% de sarcosil (N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck®) e incubando en hielo durante 10 min. El exceso de sarcosil se eliminó con papel absorbente antes de cargar el inserto en el gel de agarosa al 1.2%, disuelto en TBE 0.5X. La

cepa control (*E. coli* NCTC 50192) se colocó en los carriles extremos. Finalmente, los pozos se sellaron con agarosa a 50°C.

#### **6.7.1.5 Electroforesis**

La electroforesis se realizó en la cámara CHEF-DR II (BioRad) con 2.5 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75 µM (0.5g/L, Merck®). El gradiente de voltaje fue 6 V/cm, y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 seg durante 22 h a 14 °C.

#### **6.7.1.6 Tinción del gel y visualización**

El gel se tiñó durante 5 min con una solución acuosa de 200 ml de BET (Bio-Rad [0.05 µl/ml]), Se visualizó y digitalizó en el fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro). El gel se destiñó en agua destilada, fotografiándose periódicamente en lapsos de una hora hasta una correcta visualización.

Finalmente, el número de plásmidos se determinó contando el número de bandas observadas en el gel y para determinar el tamaño de los plásmidos se utilizó el programa Gel Quant Express (R).

#### **6.7.1.7 Modificaciones de la técnica**

Para las cepas que no fueron tipificables (C3310, C3317, C3322, C3328, C3330, C4424) por el protocolo descrito, la preparación de insertos se realizó a partir de un cultivo puro crecido durante 24 h en agar BHI (doble base de agar; [25 g/L]). El resto del protocolo se mantuvo hasta el punto 6.7.1.6; tras haberlo dejado destiñéndose en agua destilada por 24 h, el gel se tiñó nuevamente al segundo día con las mismas condiciones (5 min en una solución acuosa de 200 ml de BET (Bio-Rad [0.05 µl/ml]) y se visualizó en lapsos de una hora hasta una correcta digitalización.

#### **6.7.2 Identificación de la presencia de plásmidos por el método de Kieser**

La técnica de lisis alcalina o método de Kieser se empleó para seis cepas (C3310, C3317, C3322, C3328, C3330, C4424) que no fueron tipificables por PFGE+S1 con el protocolo descrito hasta el punto 6.7.1.6. Una vez identificada la presencia de plásmidos por el método de Kieser se realizaron modificaciones en la técnica de PFGE+S1 (ver modificaciones de la técnica en metodología, 6.7.1.7) para la determinación de número y tamaño de plásmidos.

A partir de un cultivo puro crecido en agar TSA, se tomó una colonia y se depositó en tubos con 5 ml de LB (para 1000 ml [10 g de Triptona de Caseína, 5 g de extracto de levadura, 10 g NaCl]) y se dejó crecer por 18 h a 37 °C con agitación a 200 rpm.

Una vez realizado lo anterior, se tomaron 1500 µl en un microtubo nuevo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min. Se decantó el LB procurando que la pastilla quedara con la menor cantidad de medio posible y se repitió el procedimiento hasta ocupar todo el caldo LB, posteriormente se adicionaron 400 µl de solución 1 (ver anexo) y se homogenizaron con vórtex hasta resuspender la pastilla. Se adicionaron 100 µl de lisozima (10 mg/ml) y se invirtió suavemente para mezclar. Esta mezcla, se dejó incubando a 4 °C durante 30 min.

Después del tiempo transcurrido, se le adicionaron 250 µl de solución 2 (ver anexo), se mezcló e incubó por 30 min a 55 °C. Transcurridos los 30 min, se agregaron 80 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) (Golden Bell) y se mezcló con vórtex hasta que tomó una coloración blanca uniforme. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min y del sobrenadante se tomaron 450 µl y se transfirió a un microtubo nuevo, tomando con cuidado solo la parte superior.

A los 450 µl, se le adicionaron 300 µl de acetato de potasio (Meyer) 3M, se invirtió e incubaron en hielo por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min., el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y se le agregó etanol absoluto (Golden Bell) al 100% frío, se mezcló y se incubó 5 min a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min., se decantó y se le agregaron 100 µl de etanol al 70% para luego centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min. Se decantó y se dejó secar el microtubo de 10 a 15 min. en condiciones de esterilidad. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada estéril y se conservó a -20°C.

#### **6.7.2.1 Visualización del gel de agarosa**

De los 20 µl de ADN plasmídico se tomaron 10 µl para cargarlos en un gel de agarosa al 0.7% y se sometieron a un corrimiento electroforético durante 1 h y 40 min. en Buffer TAE 1X a 100 Voltios. Para la electroforesis se usó como marcador de peso molecular la cepa de *E. coli* NCTC 50192. Posteriormente los geles se tiñeron con una solución acuosa de 200 ml de BET (Bio-Rad [0.4 µl/ml]), durante 5-10 seg y se destiñó en agua destilada durante 1 hora.

Finalmente, los geles se visualizaron y digitalizaron con ayuda de un fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro).

### 6.7.3 Tipado de plásmidos por “PCR-based replicon typing” (PBRT)

El tipado de plásmidos se realizó mediante la amplificación por PCR de replicones pertenecientes a los grupos de incompatibilidad (Inc) reportados por Carattoli y colaboradores para enterobacterias (Carattoli *et al.*, 2005). Esta técnica contempla la realización de 5 PCR múltiplex y 3 PCR simplex con los oligonucleótidos y condiciones que se describen en las tablas 7 y 8.

También se realizó la búsqueda de otros replicones no considerados en la metodología anterior, tales como IncT, IncU y el plásmido oriColE, cuyos oligonucleótidos también se muestran en la tabla 7 (García-Fernández *et al.*, 2009).

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en el método PBRT para el tipado de plásmidos.**

Replicón	Oligonucleótidos (5' - 3')	Sitio blanco	Tamaño (pb)
IncHI1 <sup>a</sup>	F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	<i>parA-parB</i>	471
IncHI2 <sup>a</sup>	F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	Iterones	644
IncI1 <sup>a</sup>	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	RNAI	139
IncX <sup>b</sup>	F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	ori	376
IncL/M <sup>b</sup>	F: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	<i>repA,B,C</i>	785
IncN <sup>b</sup>	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	<i>repA</i>	559
IncFIA <sup>c</sup>	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	Iterones	462
IncFIB <sup>c</sup>	F: TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	<i>repA</i>	702
IncW <sup>c</sup>	F: CCTAAGAACAACAAGCCCCCG R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	<i>repA</i>	242
IncY <sup>d</sup>	F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	<i>repA</i>	765
IncP <sup>d</sup>	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	Iterones	534
IncFIC <sup>d</sup>	F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	<i>repA2</i>	262
IncA/C <sup>e</sup>	F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	<i>repA</i>	465

	R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
IncT <sup>e*</sup>	F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	<i>repA</i>	750
IncF - repB <sup>e</sup>	F: TGATCGTTTTAAGGAATTTTG R: GAAGATCAGTCACACCATCC	RNAI/ <i>repA</i>	270
IncFII <sup>1</sup>	F: CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC	<i>repA</i>	270
IncK <sup>2</sup>	F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	RNAI	160
IncB/O <sup>3</sup>	F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	RNAI	159
IncR	F: TCGCTTCATTCTGCTTCAGC R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	Plásmido R	251
IncU <sup>*</sup>	F: TCACGACACAAGCGCAAGGG R: TCATGGTACATCTGGGCGC	Plásmido U	843
oriColE <sup>*</sup>	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGCGAAACCCGACAGGACT	Plásmido ColE	187
oriColETp	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGTTTACCGGTGTCATTCC	Plásmido ColETp	106

a: Multiplex 1; b: Multiplex 2; c: Multiplex 3; d: Multiplex 4; e: Multiplex 5.  
1: Simplex 1; 2: Simplex 2; 3: Simplex 3.

Para todas las PCR las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (94°C, 1 min; 60°C, 30 seg y 72°C, 1 min) y extensión final (72°C, 5 min). En el caso de la PCR simplex 1 la temperatura de alineamiento fue de 54°C (en lugar de 60°C).

\*: (García-Fernández *et al.*, 2009).

(Carattoli *et al.*, 2005).

Los reactivos y las concentraciones de los componentes empleados en esta técnica se detallan a continuación:

**Tabla 8. Componentes de PCR y su concentración utilizados en el método PBRT para el tipado de plásmidos.**

Componentes <sup>a</sup>	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final de la reacción
Buffer 10X - MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	10X	1 µl	1X
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	10 mM	0.3 µl	0.3 mM
Oligonucleótido "Forward" (Sigma)	25 µM	0.3 µl	0.75 µM
Oligonucleótido "Reverse" (Sigma)	25 µM	0.3 µl	0.75 µM
BIOTAQTM DNA Polimerasa (Bioline)	5 U/µl	0.1 µl	0.5 U

Agua	-	7.5 µl	-
ADN <sup>b</sup>	100 ng/µl	0.5 µl	-
<b>Volumen final de la reacción</b>		10 µl	

<sup>a</sup>: cantidades usadas en un PCR simplex. En el caso de las PCR múltiplex, la cantidad de oligonucleótido extra añadido fue restado del volumen de agua, conservando así el volumen final requerido.

<sup>b</sup>: se usó ADN total obtenido mediante el método de hervido.

#### 6.7.4 Caracterización de plásmidos por relaxasas

De acuerdo al método descrito por Alvarado y cols., (Alvarado *et al.*, 2012) se realizó la tipificación de plásmidos mediante la amplificación de secuencias consenso de los genes de relaxasas (MOB) utilizando oligonucleótidos degenerados para abarcar las variantes presentadas por los genes de relaxasas en una misma familia. La técnica propone la realización de 19 reacciones de PCR para determinar la presencia de igual número de las subfamilias; los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla a continuación:

**Tabla 9. Oligonucleótidos usados para la determinación de las relaxasas MOB.**

Reacción de PCR	Oligonucleótidos (5' - 3')	Condiciones de PCR <sup>a</sup>	Tamaño (pb)
<b>MOB-F11</b>	F11-f: GCAGCGTATTACTTCTCTGCTGCCGAYGAYTAYTA F1-r: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	25 ciclos, 53°C	234
<b>MOB-F12</b>	F12-f: AGCGACGGCAATTATTACACCGACAAGGAYAAAYTA YTA F1-r: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	25 ciclos, 55°C	234
<b>MOB-P11</b>	P11-f: CGTGCGAAGGGCGACAARACBTAYCA P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	25 ciclos, 60°C	180
<b>MOB-P12</b>	P12-f: GCACACTATGCAAAGATGATACTGAYCCYGT P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	30 ciclos, 53.8°C	189
<b>MOB-P13</b>	P13-f: AACCCACGCTGCAARGAYCCVGT P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	30 ciclos, 59°C	180
<b>MOB-P14</b>	P14-f: CGCAGCAAGGACACCATCAAYCAYTAYRT P1-r: AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC	25 ciclos, 50°C	174
<b>MOB-P3</b>	P3-f: CCGTGAGCCAAATCACACAGAATATKRTBTT P3-r: CGAAAGCCAACATGAACATGHGGATKHTC	25 ciclos, 50°C	177
<b>MOB-P4</b>	P4-f: GCGTTCAGGATGGTCYBTCSATGCC P4-r: CGGTTTTGACCGTCAGATGSVMATGCGG	25 ciclos, 64°C	163
<b>MOB-P51</b>	P51-f: TACCACGCCCTATGCGAARAARTAYAC P5-r: CCCTTGTCCTGGTGYTSNACCCA	30 ciclos, 58°C	167
<b>MOB-P52</b>	P52-f: GATAGCCTTGATTTTAATAACACCAAYACYTAYAC P5-r: CCCTTGTCCTGGTGYTSNACCCA	30 ciclos, 58°C	175
<b>MOB-P53</b>	P53-f: GGGCTCGCACGAYCAYACNGG P53-r: GCCCAGCCCTTTTCRTGRTRTG	30 ciclos, 65°C	345
<b>MOB-Q11</b>	Q11-f: CAATCGTCCAAGGCGAARGCNGAYTA	30 ciclos,	331

	Q11-r: CGCTCGGAGATCATCAYTTGYCAYTG	50°C	
<b>MOB-Q12</b>	Q12-f: CTGGAATATACTGAACACGGNAAYATGCC Q12-r: ATCCTTGGTGTTAGCACGTTTRAARWAYTG	30 ciclos, 52°C	341
<b>MOB-Qu</b>	Qu-f: AGCGCCGTGCTGTCCGCBGCNTAYCG Qu-r: CTCCGCAGCCTCGRCSGCRRTTCCA	30 ciclos, 64°C	179
<b>MOB-H11</b>	H11-f: CCGGCGTCCGAGAAAYCAYCAYCA H11-r: AAGGTGCTATACCTTYCCKGCRTRTG	<sup>b</sup> Touchdown PCR: comienza a 65°C $\Delta T_a = -1^\circ\text{C}$ por ciclo, 15 ciclos a 55°C	207
<b>MOB-H121</b>	H121-f: GCCAGCTTCCGAATCACAYCAYCAYCG H121-r: GTCGCTTGTCGCGCCACCGDATRAARTA	25 ciclos, 59°C	313
<b>MOB-H2</b>	H2-f: AGTTCCCAGCCTCAGAAATCCAYCAYCAYKC H2-r: GCGGACCGTGCCANGGRTGCCA	25 ciclos, 68°C	264
<b>MOB-C11</b>	C11-f: GTCAGGTCAGCGTGTGGGGNCTNAC C11-r: CTCTTACGGTGCCCTCNACYTCRAA	<sup>b</sup> Touchdown PCR: comienza a 65°C $\Delta T_a = -1^\circ\text{C}$ por ciclo, 20 ciclos a 55°C	283
<b>MOB-C12</b>	C12-f: GCACGACTGGAAAAATATCGCTATGGGGNATHAC C12-r: CAACGTGATAATCCCCTCRGGVCGRTG	30 ciclos, 59°C	257

<sup>a</sup>: Todas las reacciones de PCR fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 4 min, 25-30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 seg. alineamiento por 30 seg. y elongación a 72°C por 30 seg.) la temperatura de alineamiento y los ciclos de cada PCR se indican en la tabla y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 10 min.

<sup>b</sup>: Las PCR MOB<sub>H11</sub> y MOB<sub>C11</sub> fueron realizadas usando un protocolo de touchdown para evitar la aparición de productos inespecíficos.

Las cantidades para cada PCR fueron las mismas que se detallan en la tabla 8. (Alvarado *et al.*, 2012).

### 6.7.5 Sistemas de adicción plasmídicos

De igual manera mediante PCR se realizó la búsqueda de los 8 sistemas de adicción plasmídica:

- 5 sistemas proteicos antitoxina-regulados: PemK–PemI, codificado por el gen *pemKI* (plasmid emergency maintenance); CcdA–CcdB, gen *ccdAB* (coupled cell division locus); RelB–RelE, gen *relBE* (relaxed control of stable RNA synthesis); ParD–ParE, gen *parDE* (plásmido RK2) y VagC–VagD, gen *vapBC* (virulence-associated protein), también llamado *vagCD*.

- 3 sistemas RNA antisentido-regulados: Hok–Sok, gen *hok–sok* (host-killing system); PndA–PndC, gen *pndAC* (promotion of nucleic acid degradation) y SrnB–SrnC, codificado por el gen *srnBC* (stable RNA) (Mnif *et al.*, 2010).

Los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 10:

**Tabla 10. Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleados en la búsqueda de los sistemas de adicción plasmídicos**

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C) <sup>a</sup>	Tamaño (pb)
<i>pemKI</i>	PemK-up: AACGAGAATGGCTGGATGC PemK-low: CCAACGACACCGCAAAGC	54	232
<i>ccdAB</i>	CcdA-up: AGGAAGGGATGGCTGAGGT CcdB-low: GGTAAGTTACGGGAGAC	54	230
<i>relBE</i>	RelE-up: AAAAACCCGATGGCGACAG RelE-low: TGATAGACCAGGCGAAAAC	57	370
<i>parDE</i>	ParD-up: ACGGACCAGCAGCACCAG ParE-low: AGCCCTTGAGCCTGTCCG	58	534
<i>vagCD</i>	VagC-up: GGGACCTGGATTTTGATGG VagD-low: GAGCAGATGTTGGTGTCCG	53	210
<i>hok–sok</i>	Hok-up: AGATAGCCCCGTAGTAAGTT Sok-low: GATTTTCGTGTCAGATAAGTG	54	203
<i>pndAC</i>	PndC-up: TCAATCAACCAGGGCTCT PndA-low: CCTCACCATCCAGACAAAA	52	140
<i>srnBC</i>	SrnB-up: ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT SrnC-low: CACCACTGTATTTCCCCTGT	54	171

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (94°C, 45 seg; <sup>a</sup>, 45 seg y 72°C, 45 seg) y extensión final (72°C, 5 min).  
<sup>a</sup>: temperatura de alineamiento para cada reacción de PCR.

Las cantidades para cada PCR fueron las mismas que se detallan en la tabla 8. (Mnif *et al.*, 2010).

## 6.8 Identificación de secuencias de inserción y transposones

La búsqueda de las secuencias de inserción ISE<sub>cp1</sub> e IS26 se realizó mediante la técnica de PCR a 26 cepas, e *in silico* a las 12 cepas secuenciadas. Los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 11. Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleados en la búsqueda de ISE<sub>cp1</sub> e IS26.**

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño (pb)	Condiciones	Referencia
<i>ISE<sub>cp1</sub></i>	ISE <sub>cp1</sub> -F: TCTGCTCCTTGAGAATGCA	1207	94°C 5 min 94°C 1 min	Barrios-Villa, 2019 (condiciones)

	ISEcp1-R: CATACACTCCCTTGTACGGA		60°C 1min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 10 min 10°C ∞	modificadas en este estudio)
<b>IS26</b>	IS26F2: ATTCAAAGGCCGGCATTTC IS26r: TCAAAAACCTCTGCTTACCAGGC	689	95°C 3 min 95°C 20 seg 60°C 30seg 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 30 seg 4°C ∞	Barrios-Villa, 2019 (condiciones modificadas en este estudio)

La búsqueda de transposones se realizó *in silico* en las 12 cepas secuenciadas.

### 6.9 Secuenciación y análisis bioinformático

Con base en los resultados obtenidos en 2018 por Barrios-Villa, previo al presente trabajo, se seleccionaron cuatro cepas con fenotipo BLEE provenientes de cerdo (1) y pollo (3), y ocho cepas productoras de CMY-2 provenientes de igual forma de cerdo (2) y pollo (6) (Barrios-Villa, *et al.*, 2018). Posteriormente se extrajo los ADN de las cepas bacterianas y fueron enviados de acuerdo a los requerimientos de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA-IBt-UNAM en la ciudad de Cuernavaca, Mor., secuenciando los genomas bacterianos utilizando la tecnología Illumina NextSeq 500 2x75. El ensamble se realizó utilizando Spades Genome Assembler (v3.15.4) (Bankevich *et al.*, 2012).

Adicionalmente, con base en la resistencia a fosfomicina, se seleccionaron las cepas C3302, C3311, C3314, C3315, C3321 y C3327 previamente secuenciadas por la tecnología Illumina, para ser secuenciadas por MinION de Oxford Nanopore y realizar el ensamble híbrido utilizando Spades Genome Assembler (v3.15.4) y Unicycler v3 (Wick *et al.*, 2017).

El análisis de las secuencias se realizó en el servidor del Centro de Epidemiología Genómica (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) para:

- Identificación de genes de resistencia: ResFinder (v4.1), CARD (v3.2.9).
- Identificación de plásmidos: PlasmidFinder (v2.1).
- Tipo de secuencia multilocus (MLST): SeroTypeFinder (v2.0), PubMLST
- Identificación de genes de virulencia: VirulenceFinder (2.0).
- Identificación de transposones: MobileElementFinder

- Elementos de conjugación: oriT Finder (v1.1).
- Identificación de Filogrupo: Clermonttyping (v1.4.0).

Además de la ayuda de las siguientes herramientas bioinformáticas:

- BLAST, NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Sequence Massager (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>)
- Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
- Translate tool ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>)
- ISFinder (<https://www-is.biotoul.fr/index.php>)
- MOBscan ([https://castillo.dicom.unican.es/mobscan\\_about/](https://castillo.dicom.unican.es/mobscan_about/))
- Proksee (<https://proksee.ca/>)

Para determinar las variantes de los genes de resistencia se usó como referencia los genes de la base de datos The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Viabilidad y pureza de cepas de *E. coli*

Se comprobó la viabilidad y pureza de las 38 cepas de *E. coli*; 6 provenientes de cerdo y 32 provenientes de pollo. El nombre y origen de las cepas que se incluyeron en este estudio se muestran en la tabla 1.

### 7.2 Perfil fenotípico de susceptibilidad mediante Kirby Bauer a colistina y fosfomicina

De un total de 38 cepas, tres cepas presentaron fenotipo de resistencia a colistina mientras el 50% (19/38) de las cepas presentaron una susceptibilidad intermedia o resistente frente a fosfomicina de acuerdo con los estándares establecidos por el CLSI, 2024 (figura 2).

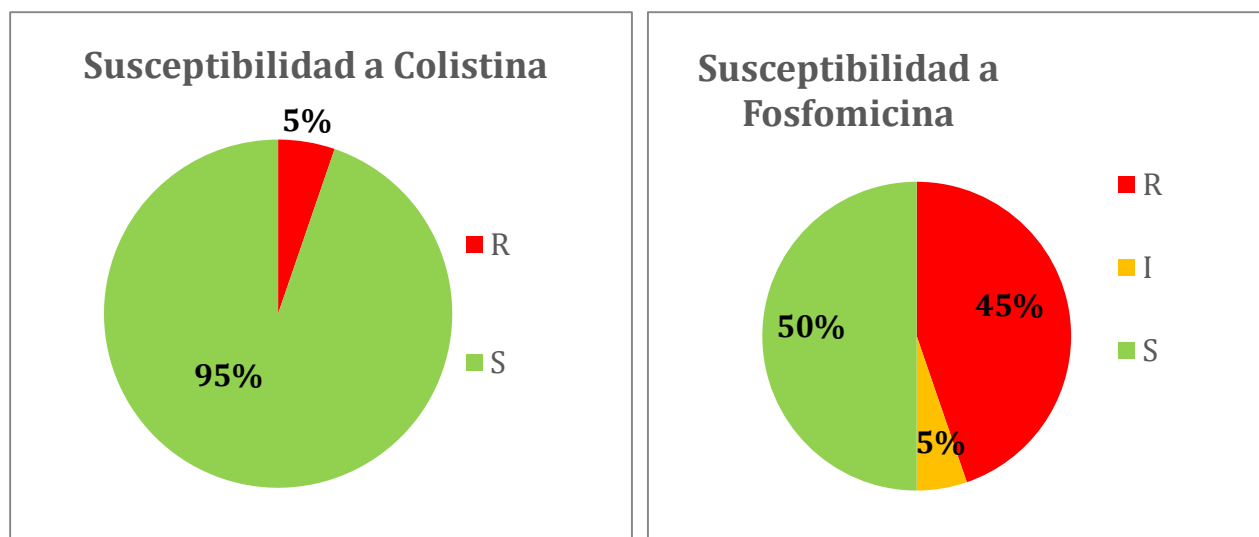


Figura 2. Resultados del perfil de susceptibilidad hacia colistina y fosfomicina de cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos. Mediante el método de Kirby-Bauer (CLSI, 2024). R: Resistente, I: Intermedia, S: Sensible.

### 7.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria a Colistina y Fosfomicina

El 5.26% (2/38) de las cepas fueron resistentes a colistina, presentando una concentración mínima inhibitoria de 16 µg/ml, mientras que, para fosfomicina el 47% (18/38) se confirmó como resistentes al presentar una concentración mínima inhibitoria  $\geq 256$  µg/ml. La concentración mínima inhibitoria correspondiente a cada cepa se muestra en la tabla 12. De acuerdo con los estándares del CLSI, 2024, el punto de corte de resistencia para fosfomicina es  $\geq 256$  µg/ml, y para colistina es  $\geq 4$  µg/ml (CLSI, 2024).

**Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria hacia fosfomicina y colistina de las 20 cepas de *E. coli* de alimentos (18 resistentes a fosfomicina y 2 resistentes a colistina).**

CEPA	CMI FOSFOMICINA (µg/mL)	CMI COLISTINA (µg/mL)
C2336	1024	NA
C2337	1024	NA
C2339	1024	NA
C3297	512	NA
C3298	>1024	NA
C3302	1024	NA
C3306	256	NA
C3310	NA	16
C3311	512	NA
C3312	64	16
C3314	>1024	NA
C3315	1024	NA
C3319	512	NA
C3320	>1024	NA
C3321	>1024	NA
C3322	512	NA
C3323	>1024	NA
C3324	>1024	NA
C3327	1024	NA
C4424	512	NA

El valor de la CMI correspondiente a cada cepa fue sombreado de acuerdo con los estándares del CLSI, 2024. Rojo: Resistente. Verde: Sensible. NA: No aplica (presentaron fenotipo de sensibilidad mediante Kirby-Bauer).

#### 7.4 Identificación de variantes de los genes *fosA* y *mcr*.

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar las variantes de *fosL*, *fosA7* y *fosA3*, además de emplear los oligonucleótidos degenerados (Freire *et al.*, 2023; Güneri, *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022) para buscar el resto de las variantes ya reportadas del gen *fosA* (*fosA1*, *fosA2*, *fosA4*, *fosA5*, *fosA6*, *fosA8*, *fosA9*, *fosA10*) en todas las cepas que presentaron resistencia a fosfomicina. De las 18 cepas con fenotipo de resistencia a fosfomicina, 7 cepas presentaron por *in vitro* probable gen *fosA7*, sin embargo, se requiere corroborar por secuenciación, mientras que, *in silico* se encontraron 5 cepas que presentaban el gen *fosA7.5*. En cuanto al gen *fosL*, de forma *in vitro* 2 cepas presentaron el gen *fosL1*, mientras que, *in*

*in silico* una cepa presentó el gen *fosL1*. En la tabla 13 se muestran cuáles fueron los genes identificados en cada cepa.

Respecto a las 2 cepas resistentes a colistina, se buscaron los genes *mcr-1* y *mcr-2* con el uso de oligonucleótidos degenerados; sin embargo, el resultado fue negativo para ambos genes.

**Tabla 13. Determinación de las variantes de los genes *fosA* y *fosL* en las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos.**

<b>CEPA</b>	<b>Gen <i>fos</i></b>
<b>C2336</b>	<i>fosL1</i>
<b>C2337</b>	<i>fosA7</i>
<b>C2339</b>	<i>fosA7</i>
<b>C3297</b>	<i>fosL1</i>
<b>C3298</b>	<i>fosA7</i>
<b>C3302</b>	<i>fosA7.5*</i>
<b>C3306</b>	NI
<b>C3311</b>	<i>fosL1*</i>
<b>C3314</b>	<i>fosA7.5*</i>
<b>C3315</b>	<i>fosA7.5*</i>
<b>C3319</b>	<i>fosA7</i>
<b>C3320</b>	<i>fosA7</i>
<b>C3321</b>	<i>fosA7.5*</i>
<b>C3322</b>	NI
<b>C3323</b>	NI
<b>C3324</b>	<i>fosA7</i>
<b>C3327</b>	<i>fosA7.5*</i>
<b>C4424</b>	<i>fosA7</i>

\*: variantes identificadas *in silico*. NI: No identificado.

En la tabla 14 se muestra el resumen del origen de los aislados, junto con el fenotipo y genotipo de resistencia hacia fosfomicina y colistina de las cepas de *E. coli*.

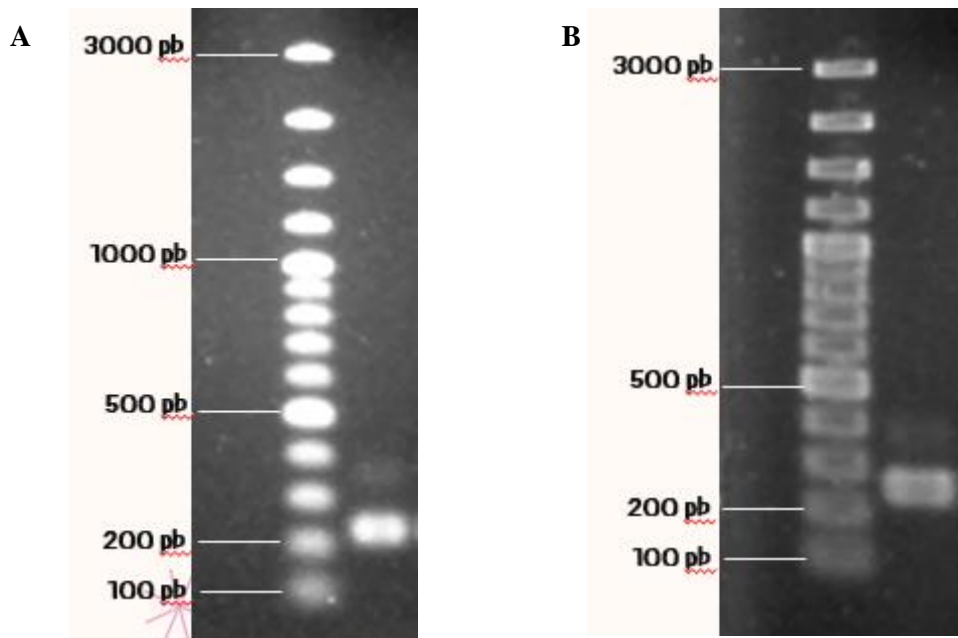
**Tabla 14. Características del perfil de susceptibilidad frente a colistina y fosfomicina de las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos.**

CEPA	Origen	CMI FOSFOMICINA (µg/mL)	CMI COLISTINA (µg/mL)	Gen <i>fos</i>	Gen <i>mcr</i>
C2336	Pollo	1024	NA	<i>fosL1</i>	NA
C2337	Pollo	1024	NA	<i>fosA7</i>	NA
C2339	Cerdo	1024	NA	<i>fosA7</i>	NA
C3297	Pollo	512	NA	<i>fosL1</i>	NA
C3298	Pollo	>1024	NA	<i>fosA7</i>	NA
C3302	Cerdo	1024	NA	<i>fosA7.5*</i>	NA
C3306	Pollo	256	NA	NI	NA
C3310	Pollo	NA	16	NA	NI
C3311	Pollo	512	NA	<i>fosL1*</i>	NA
C3312	Cerdo	64	16	NA	NI
C3314	Pollo	>1024	NA	<i>fosA7.5*</i>	NA
C3315	Pollo	1024	NA	<i>fosA7.5*</i>	NA
C3319	Pollo	512	NA	<i>fosA7</i>	NA
C3320	Pollo	>1024	NA	<i>fosA7</i>	NA
C3321	Pollo	>1024	NA	<i>fosA7.5*</i>	NA
C3322	Pollo	512	NA	NI	NA
C3323	Pollo	>1024	NA	NI	NA
C3324	Pollo	>1024	NA	<i>fosA7</i>	NA
C3327	Pollo	1024	NA	<i>fosA7.5*</i>	NA
C4424	Pollo	512	NA	<i>fosA7</i>	NA

El valor de la concentración mínima inhibitoria correspondiente a cada cepa fue sombreado de acuerdo con los estándares del CLSI, 2024. Rojo: Resistente. Verde: Sensible. NA: No aplica (presentaron fenotipo de sensibilidad mediante Kirby-Bauer). NI: No identificado. \*: variantes identificadas *in silico*.

### 7.5 Búsqueda de genes que codifican a la toxina Shiga

Se estandarizaron las condiciones para la amplificación de los genes *stx1* y *stx2* (figura 3), utilizando la cepa de *E. coli* O157:H7 EDL933, donada por la Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández; sin embargo, el resultado fue negativo para todas las cepas de este estudio.



**Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de los corrimientos electroforéticos de las PCR para la amplificación de los genes *stx1* y *stx2*. El panel A muestra el corrimiento electroforético de la amplificación de la PCR del gen *stx1* (227 pb) de la cepa control *E. coli* O157:H7 EDL933. Panel B muestra la imagen de la amplificación del corrimiento de la PCR del gen *stx2* (255 pb).**

## **7.6 Determinación del perfil plasmídico de las cepas de *E. coli* y caracterización plasmídica.**

### **7.6.1 Perfil plasmídico de las cepas de *E. coli***

El tamaño y el número de plásmidos de las cepas se muestran en la tabla 15. Todas las cepas presentaron al menos un plásmido, mientras que, el mayor número de plásmidos fue de cinco. En cuanto a su tamaño, la mayoría de los plásmidos tuvieron un tamaño mayor o alrededor de 100 kb (figuras 4 y 5). Los plásmidos más pequeños identificados en las cepas originarias de cerdo y pollo presentaron un tamaño de 51 y 14 kb, mientras que los de mayor tamaño fueron de 437 y 396 kb respectivamente (tabla 15).

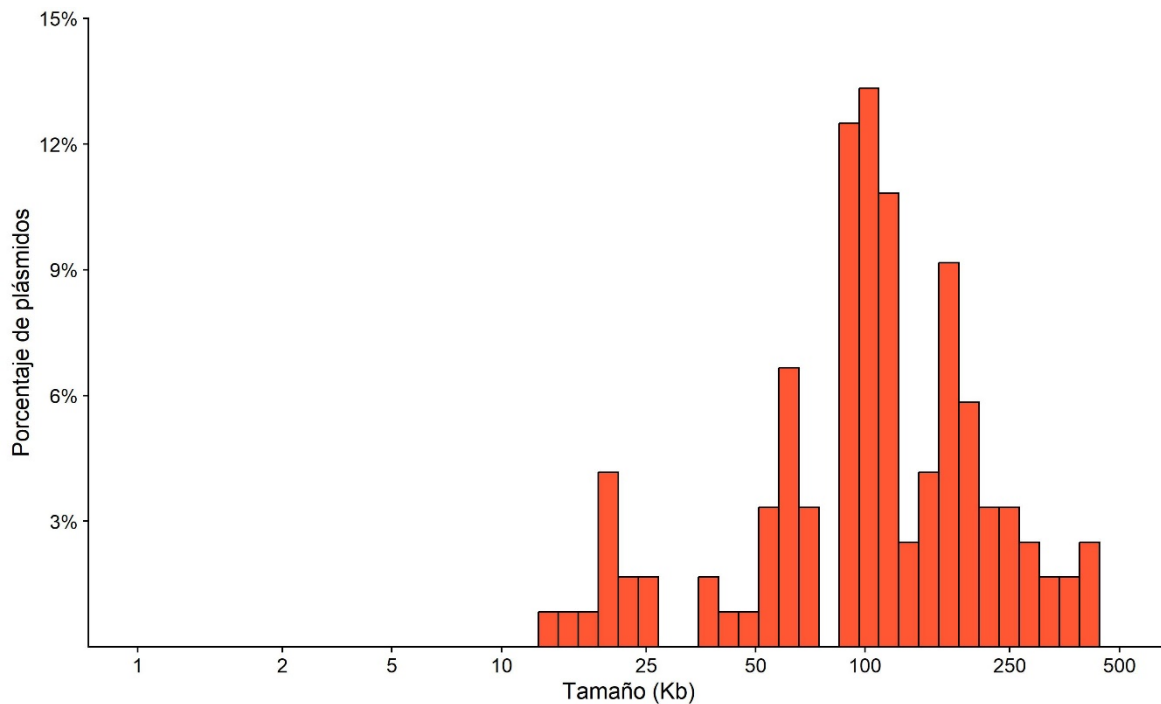
**Tabla 15. Número y tamaño de plásmidos contenidos en las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos, obtenido mediante Electroforesis de Campos Pulsados con la enzima S1.**

Cepa	Origen	Plásmidos identificados por PFGE – S1	
		Número	Tamaño (kb)
C3308	Cerdo	4	110, 104, 71, <b>51</b>
C3309	Cerdo	3	179, 121, 104
C2339	Cerdo	2	<b>437</b> , 137

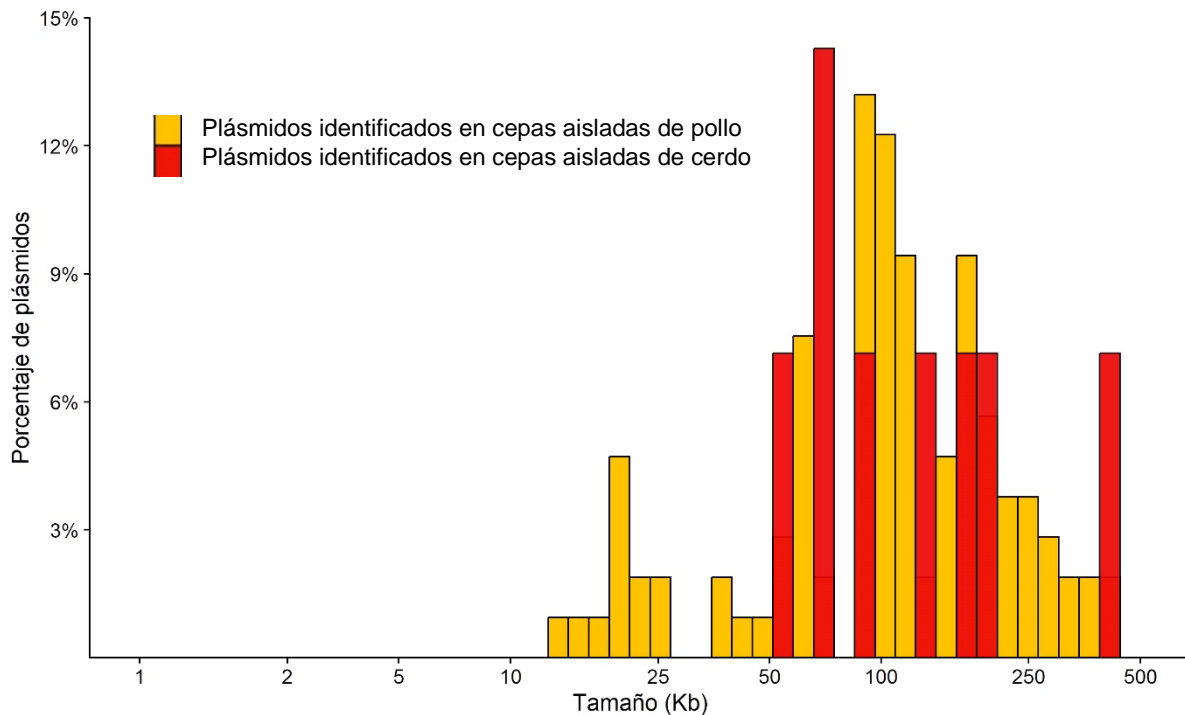
C3316	Cerdo	2	185, 88
C3302	Cerdo	2	121, 71
C3312	Cerdo	1	106
C3320	Pollo	5	287, 218, 177, 61, 41
C3304	Pollo	5	212, 181, 158, 68, 52
C2336	Pollo	5	193, 168, 151, 99, 60
C3307	Pollo	5	184, 97, 25, 23, 20
C2338	Pollo	5	168, 121, 114, 86, 59
C3329	Pollo	4	<b>396</b> , 95, 88, 60
C3300	Pollo	4	378, 98, 62, 20
C3303	Pollo	4	339, 103, 95, 88
C2337	Pollo	4	293, 223, 98, 86
C3306	Pollo	4	272, 254, 135, 20
C3324	Pollo	4	261, 122, 100, 19
C3310	Pollo	4	252, 45, 27, <b>14</b>
C3330	Pollo	4	243, 170, 112, 68
C3313	Pollo	4	197, 104, 92, 17
C3330	Pollo	4	192, 165, 122, 100
C3325	Pollo	4	167, 112, 90, 39
C3298	Pollo	3	357, 179, 94
C3317	Pollo	3	314, 166, 122
C3299	Pollo	3	233, 150, 117
C3314	Pollo	3	197, 103, 95
C3315	Pollo	3	196, 99, 62
C3327	Pollo	3	173, 91, 39
C3319	Pollo	3	122, 90, 61
C3297	Pollo	2	437, 139

C3305	Pollo	2	156, 100
C3322	Pollo	2	141, 20
C3318	Pollo	2	119, 62
C3323	Pollo	2	92, 54
C3328	Pollo	2	21, 16
C3311	Pollo	1	106
C3321	Pollo	1	103
C3326	Pollo	1	90
C4424	Pollo	1	55

Se muestra el número y tamaño de plásmidos obtenidos mediante Electroforesis de Campos Pulsados con la enzima S1. Cepa control: NCTC 50192 que contiene que contiene 4 plásmidos de tamaño conocido (156, 61, 40 y 7 kb). Las cepas fueron ordenadas de acuerdo con origen y número de plásmidos que presentaron cada una. En negritas se muestra el mayor y menor tamaño de acuerdo con el origen de la cepa.



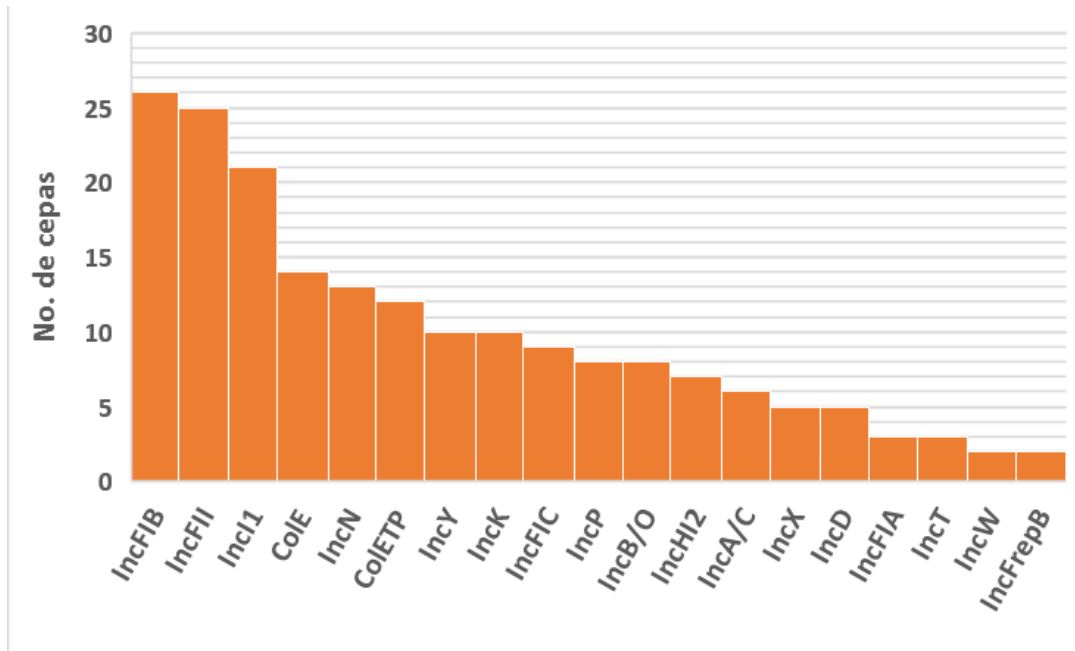
**Figura 4. Porcentaje y tamaño de plásmidos presentes en cepas de *E. coli* aisladas de carne de cerdo y pollo. n= 120 plásmidos.**



**Figura 5. Comparación del porcentaje y tamaño de plásmidos de las cepas de *E. coli* de acuerdo con su origen. n= 120 plásmidos.**

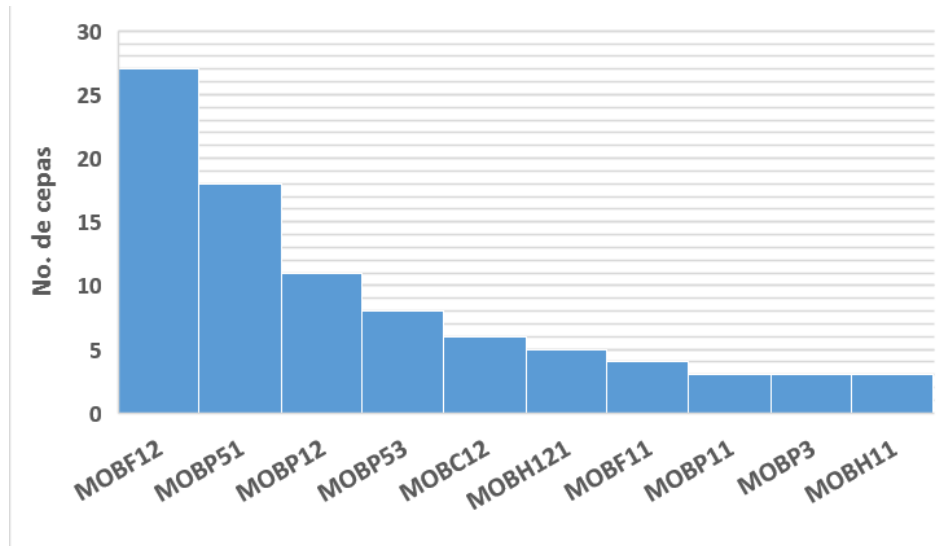
### 7.6.2 Caracterización plasmídica de las cepas de *E. coli*

Los resultados de la caracterización de plásmidos de las cepas de *E. coli*, mostraron que el replicón encontrado en mayor proporción fue IncFIB (n=26), seguido de IncFII (n=25) e IncI1 (n= 21), los replicones ColE y ColETp se encontraron en 14 y 12 cepas respectivamente, mientras que IncN en 13 cepas, e IncY junto con IncK en 10 cepas. El resto de replicones se encontró en menor proporción, identificándose IncX e IncD en 5 cepas, IncFIA e IncT en 3 cepas, e IncW, IncFrepB en 2 cepas (figura 6). En promedio se identificaron 5 grupos de incompatibilidad por cepa. De acuerdo con su origen, los replicones identificados con mayor frecuencia en las cepas aisladas de cerdo (n=6), fueron IncFIB (5/6), seguido de IncFII (4/6) e IncFIC, IncI1, IncK y OricolE (3/6), mientras que en las cepas aisladas de pollo (n=32) los replicones identificados con mayor frecuencia fueron IncFIB (23/32), seguido de IncFII (22/32) e IncI1 (18/32) (figura 9).



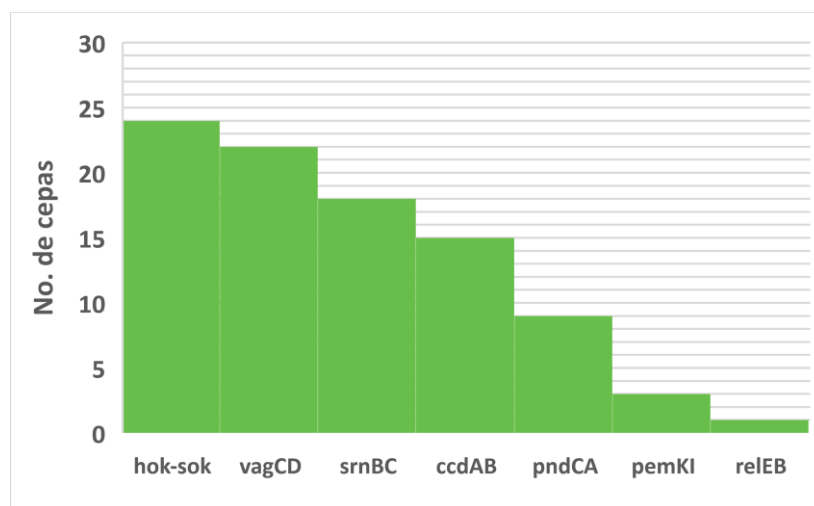
**Figura 6. Grupos de Incompatibilidad plasmídica presentes en las cepas de *E. coli* aisladas de carne de cerdo y pollo. n= 38 cepas.**

Con relación a la caracterización por relaxasas, MOB-F12 fue la más común (n=27), seguida de MOB-P51 (n=18) y MOB-P12 (n=11), mientras que, en menor proporción se presentaron MOB-P11, MOB-P3 Y MOB-H11 en tres cepas cada una (figura 7). Con excepción de la cepa C4424 aislada de carne de pollo donde no se encontró ninguno de los genes de relaxasa buscados, el resto de cepas trabajadas presentaron de una hasta cinco tipos de relaxasas (figura 9). De acuerdo a su origen, las relaxasas identificadas con mayor frecuencia en las cepas aisladas de cerdo (n=6), fueron MOB-F12 (4/6) y MOB-P51 (3/6), al igual que en las cepas aisladas de pollo (n=32) donde las relaxasas identificadas con mayor frecuencia fueron MOB-F12 (23/32) y MOB-P51 (15/32) (figura 9).



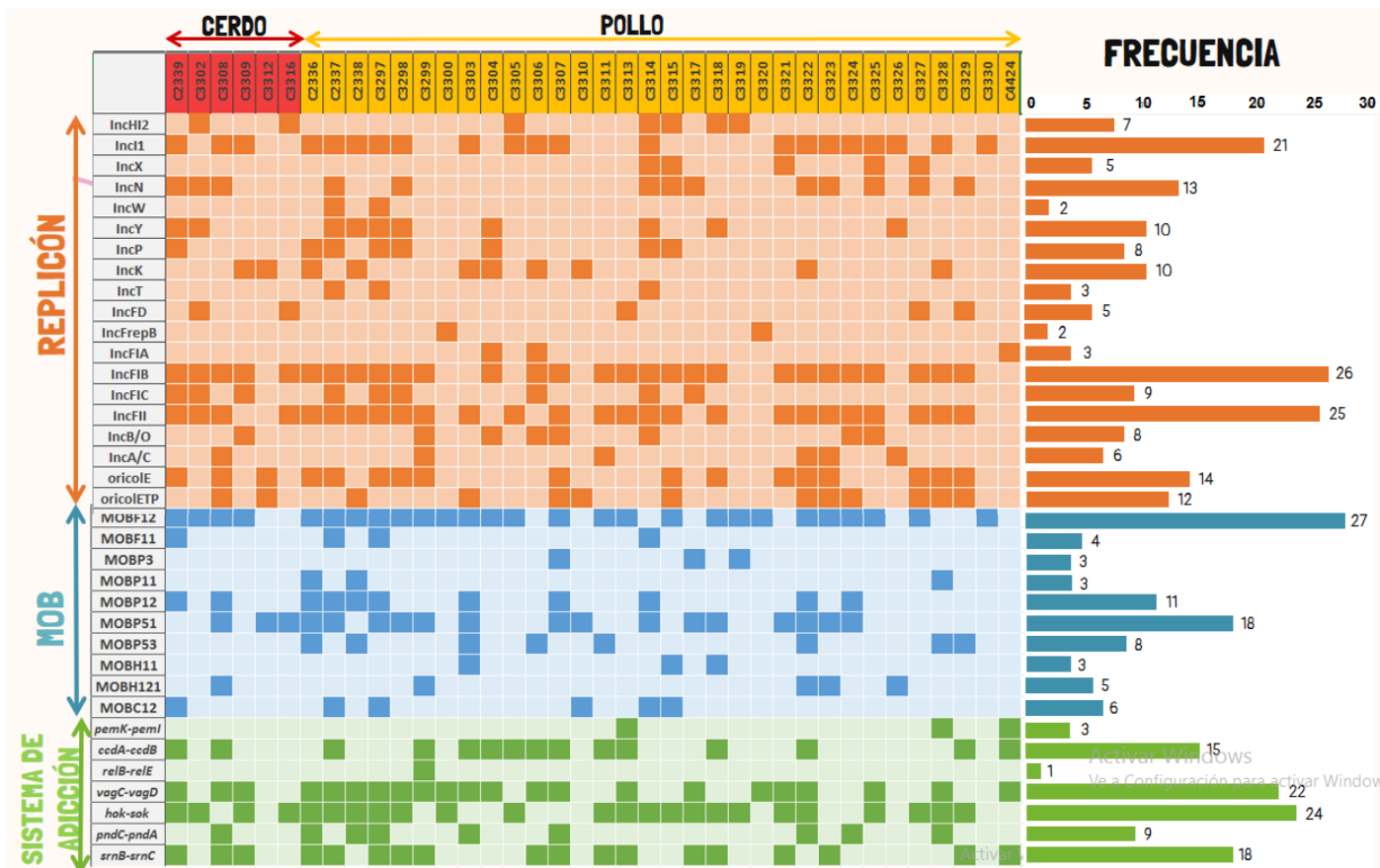
**Figura 7. Relaxasas presentes en las cepas de *E. coli* aisladas de carne de cerdo y pollo. n= 38 cepas.**

En cuanto a los sistemas de adicción plasmídica, se identificaron de uno hasta cinco sistemas por cepa, excepto en cuatro cepas donde no se identificaron genes que codifican a los sistemas buscados (figura 8), siendo *hok-sok* el más común (n=24), seguido de *vagCD* (n=22) y *srnBC* (n=18), mientras que el sistema menos común fue *relEB*, identificado únicamente en una cepa. De acuerdo a su origen, los sistemas identificados con mayor frecuencia fueron los mismo; en las cepas aisladas de cerdo (n=6), *hok-sok* (4/6), *vagCD* (3/6) y *srnBC* (3/6), y en las cepas aisladas de pollo (n=32) *hok-sok* (20/32), *vagCD* (19/32) y *srnBC* (15/32) (figura 9).



**Figura 8. Sistemas de adicción de los plásmidos presentes en cepas de *E. coli* aisladas de carne de cerdo y pollo. n= 38 cepas.**

En la figura 9 se muestra el resumen de las características plasmídicas de las cepas respecto al origen, número de plásmidos e identificación de los replicones, relaxasas y sistemas de adicción plasmídica presentes en cada cepa.



**Figura 9. Características plasmídicas presentes en las cepas de *E. coli* aisladas de carne de cerdo y pollo.** Los recuadros en color intenso representan presencia, los recuadros en colores claros representan ausencia.

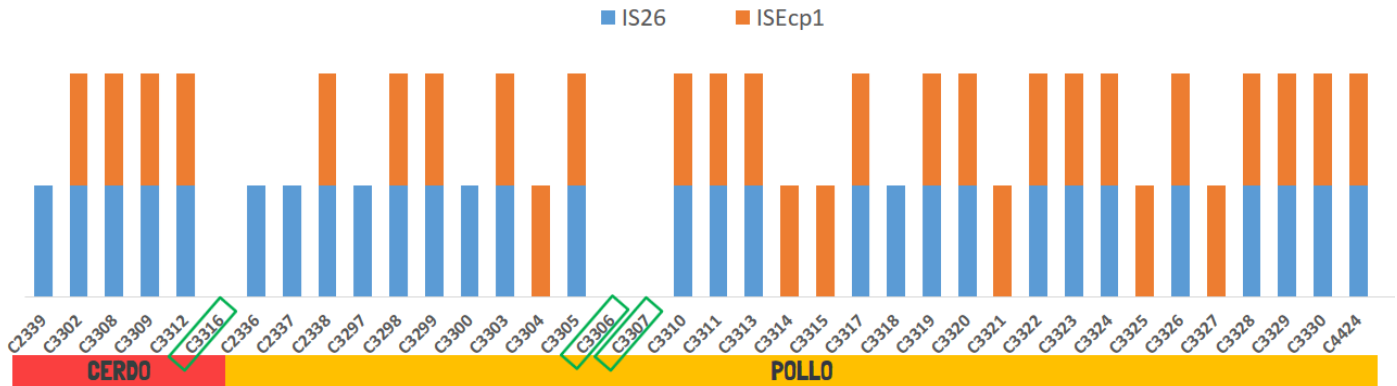
Los resultados de la tabla 15 junto con los de la figura 9, muestran que todas las cepas provenientes de carne de cerdo poseen un mayor número de replicones en comparación al número de plásmidos identificados por PFGE, mientras que las cepas provenientes de pollo no tuvieron una relación entre el número de replicones y el número de plásmidos.

## 7.7 Identificación de secuencias de inserción y transposones

### 7.7.1 Identificación de secuencias de inserción

Tras ser analizadas 26 cepas de forma *in vitro* y 12 *in silico*, se identificó que, el 60% (23/38) de las cepas de este estudio presentaron tanto IS26 como ISEcp1, el 16% (6/38) IS26, y otro

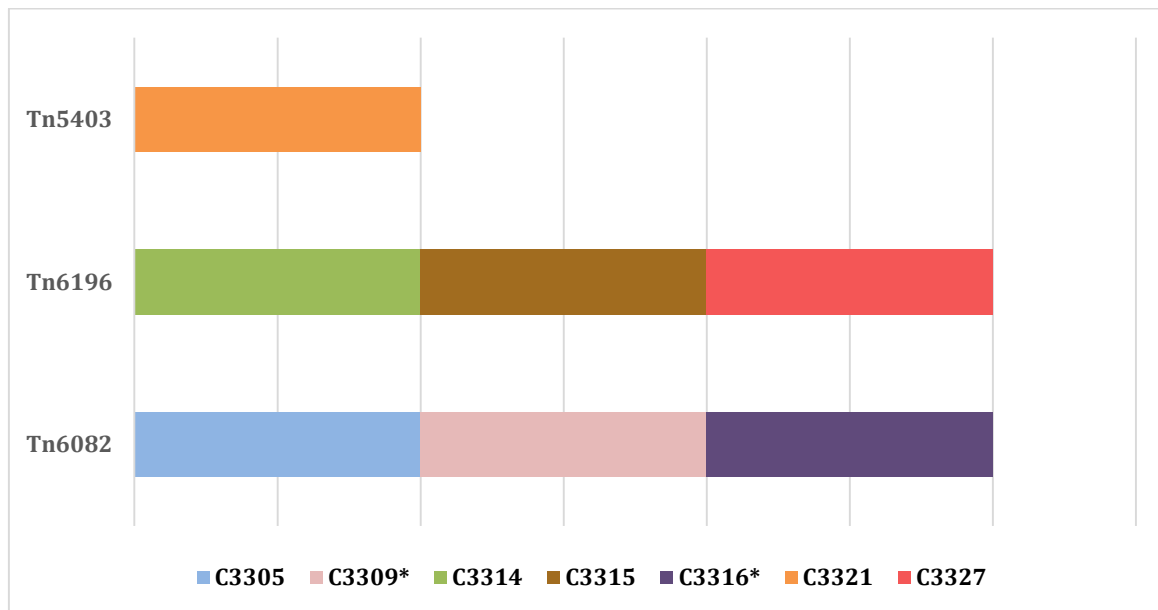
16% ISEcp1, mientras que el 8% (3/38) no presentó ninguna de las secuencias de inserción buscadas (figura 10).



**Figura 10. Secuencias de inserción identificadas en las cepas de *E. coli*.** Las cepas sin presencia de las secuencias de inserción buscadas se señalan en los recuadros verdes.

### 7.7.2 Identificación de transposones

*In silico*, en los 12 genomas secuenciados se identificaron transposones en 7 cepas, los transposones Tn6082 y Tn6196 en tres cepas diferentes cada uno, además de Tn5403 únicamente en una cepa, siendo todos pertenecientes a la familia Tn3; lo cual significa que más del 50% de las cepas secuenciadas presentaron transposones de la familia Tn3.



**Figura 11. Transposones identificados en las cepas de *E. coli*.** Las cepas con asterisco fueron aisladas de carne de cerdo. Las cepas sin asterisco fueron aisladas de carne de pollo.

### 7.8 Análisis bioinformático de 12 genomas de *E. coli*

Los criterios de selección de acuerdo a los resultados de fenotipo BLEE e identificación de CMY-2 obtenidos en 2018 por Barrios-Villa, se muestran en la tabla 16. (Barrios-Villa, *et al.*, 2018).

**Tabla 16. Criterios de selección para secuenciación por tecnología Illumina de las cepas de *E. coli* aisladas de carne de cerdo y pollo.**

Cepa	Origen	Fenotipo BLEE	Identificación de $\beta$ -lactamasa AmpC
C3302	Cerdo	+	NI
C3304	Pollo	-	CMY-2
C3305	Pollo	-	CMY-2
C3306	Pollo	-	CMY-2
C3309	Cerdo	-	CMY-2
C3311	Pollo	-	CMY-2
C3314	Pollo	+	NI
C3315	Pollo	+	NI
C3316	Cerdo	-	CMY-2
C3321	Pollo	-	CMY-2
C3325	Pollo	-	CMY-2
C3327	Pollo	+	NI

NI: No identificada

Lo primero que se realizó fue la identificación de filogrupo, serotipo y secuenciotipo mediante análisis *in silico* en las cepas secuenciadas (tabla 17), encontrando que el filogrupo A fue identificado con mayor frecuencia (6/12); el serotipo O7:H4 junto con el ST3498 se identificó en 2 cepas y los antígenos O103, H21, H34 y H16 fueron identificados en cepas diferentes además del secuenciotipo ST10, sin embargo, 5 secuenciotipos no fueron tipificados por el esquema de Pasteur.

**Tabla 17. Filogrupo, serotipo y secuenciotipo de las cepas de *E. coli* secuenciadas.**

Cepa	Origen	Filogrupo	Serotipo	Secuenciotipo (Achtman/Pasteur)
C3302	Cerdo	E	O-: H34	ST1266 / ST773
C3304	Pollo	F	O40: H34	ST10607 / ST39
C3305	Pollo	A	O117: H42	ST2207 / No tipificado
C3306	Pollo	A	O5: H10	ST93 / ST83
C3309	Cerdo	E	O128ac: H25	ST57 / ST533
C3311	Pollo	D	O3: H16	ST2309 / No tipificado
C3314	Pollo	A	O7: H4	ST3498 / No tipificado
C3315	Pollo	A	O7: H4	ST3498 / No tipificado
C3316	Cerdo	A	O105: H32	ST10 / No tipificado
C3321	Pollo	B1	O103:H21	ST359 / ST88
C3325	Pollo	B1	O163: H23	ST224 / ST479
C3327	Pollo	A	O101: H10	ST617 / ST741

En las 12 cepas secuenciadas se realizó la búsqueda *in silico* de los genes *stx1*, *stx2*, *st* y *lt*, sin embargo, el resultado fue negativo para las 12 cepas.

Con base en el análisis de secuenciación por tecnología Illumina, en 10 cepas se identificaron mutaciones de genes asociados a la resistencia a fosfomicina, tales como *cyaA*, *glpT* y *uhpT*, a su vez, en 6 cepas se identificaron genes asociados a las metaloenzimas FosA y FosL, lo cuál dio pauta a seleccionar dichas cepas para ser secuenciadas por tecnología Nanopore. Tras el ensamble híbrido se identificaron en contigs extracromosómicos elementos de maquinaria de conjugación, tales como sistemas de secreción tipo 4 (T4SS), proteínas de acoplamiento tipo 4 (T4CP), *oriT* y relaxasas. Las características determinadas *in vitro* e *in silico* de las 12 cepas secuenciadas junto con la tecnología de secuenciación se muestran en la tabla 18.

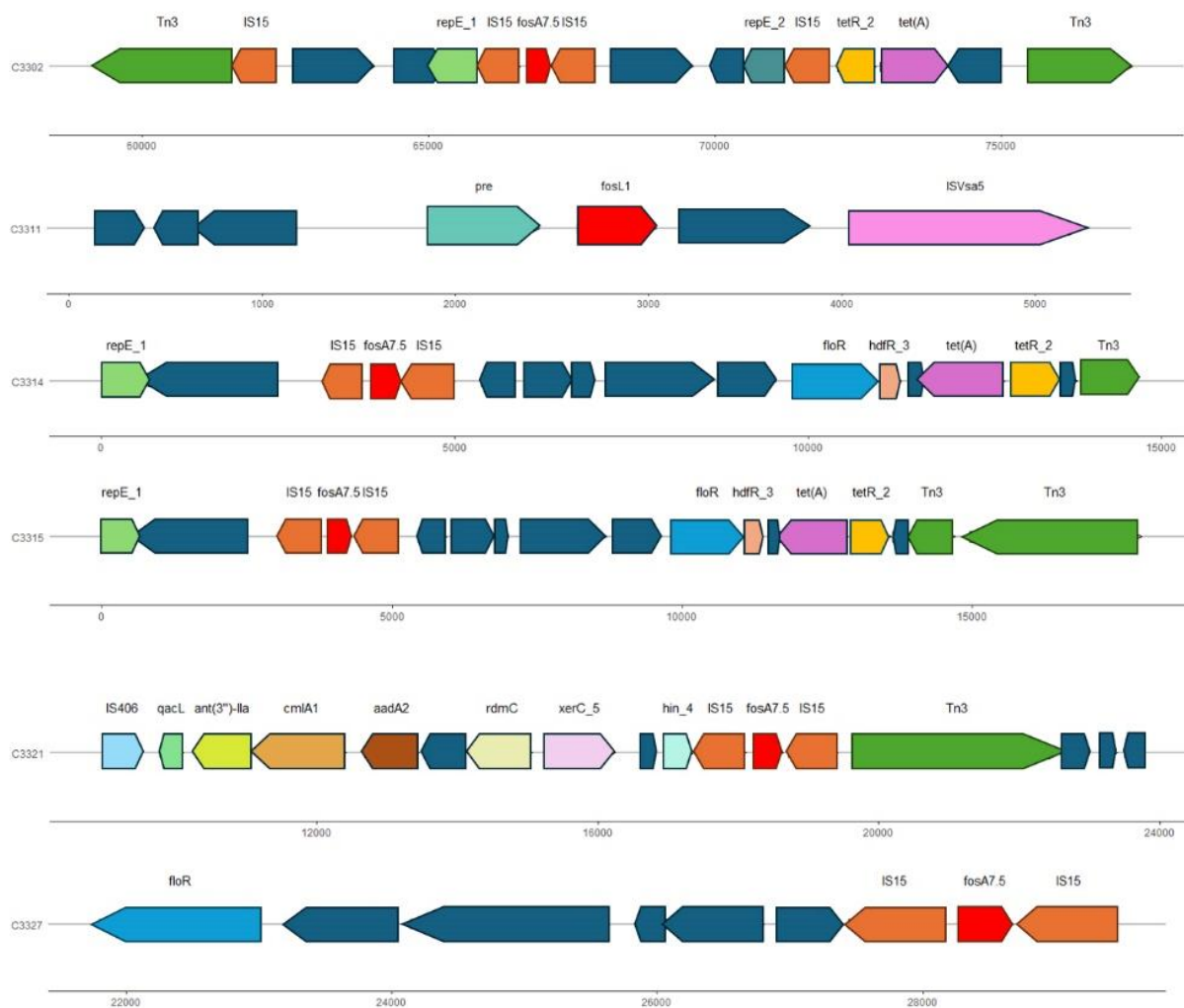
**Tabla 18. Características asociadas a resistencia de las cepas de *E. coli* secuenciadas.**

Cepa	Origen	Fenotipo de resistencia a fosfomicina	Identificación de gen <i>fos</i>	Mutaciones relacionadas a resistencia a fosfomicina	Elementos de maquinaria de conjugación	Tecnología de secuenciación
C3302	Cerdo	Resistente	<i>fosA7.5</i>	Mutación de <i>glpT</i> (Glu448Lys)	T4SS, T4CP, <i>oriT</i> y MOB-F	Illumina / Nanopore
C3304	Pollo	Sensible	NI	Mutación de <i>cyaA</i> (Ser352Thr), y <i>uhpT</i> (Glu350Gln)	MOB-F	Illumina
C3305	Pollo	Sensible	NI	NI	MOB-F	Illumina
C3306	Pollo	Resistente	NI	Mutación de <i>cyaA</i> (Ser352Thr), y <i>glpT</i> (Glu448Lys)	MOB-P	Illumina
C3309	Cerdo	Sensible	NI	Mutación de <i>glpT</i> (Glu448Lys)	MOB-F	Illumina
C3311	Pollo	Resistente	<i>fosL1</i>	Mutación de <i>cyaA</i> (Ser352Thr), y <i>glpT</i> (Glu448Lys)	MOB-F y MOB-P	Illumina / Nanopore
C3314	Pollo	Resistente	<i>fosA7.5</i>	Mutación de <i>cyaA</i> (Ser352Thr), y <i>glpT</i> (Glu448Lys)	MOB-F, MOB-P y MOB-C	Illumina / Nanopore
C3315	Pollo	Resistente	<i>fosA7.5</i>	Mutación de <i>cyaA</i> (Ser352Thr), y <i>glpT</i> (Glu448Lys)	MOB-F, MOB-H y MOB-C	Illumina / Nanopore
C3316	Cerdo	Sensible	NI	NI	MOB-P	Illumina
C3321	Pollo	Resistente	<i>fosA7.5</i>	Mutación de <i>glpT</i> (Glu448Lys)	T4SS, T4CP, <i>oriT</i> y MOB-P	Illumina / Nanopore
C3325	Pollo	Sensible	NI	Mutación de <i>uhpT</i> (Glu350Gln) y <i>glpT</i> (Glu448Lys)	MOB-F	Illumina
C3327	Pollo	Resistente	<i>fosA7.5</i>	Mutación de <i>glpT</i> (Glu448Lys)	T4SS, T4CP, <i>oriT</i> y MOB-F	Illumina / Nanopore

NI: No identificado.

Con base en la resistencia a fosfomicina y la identificación de los genes *fosA7.5* y *fosL1*, el análisis bioinformático se centró en la búsqueda del entorno de dichos genes. La figura 12 muestra una representación de los entornos genéticos de *fosA7.5* y *fosL* identificados en las 6 cepas secuenciadas, dónde se observa la presencia de secuencias de inserción IS15 y transposones de la familia Tn3, además de proteínas hipotéticas y genes asociados a conferir resistencia a otros antibióticos como *tetR*, *tet(A)*, *floR*, *cmlA1*, *ant(3'')-lla* y *aadA2*, los cuales

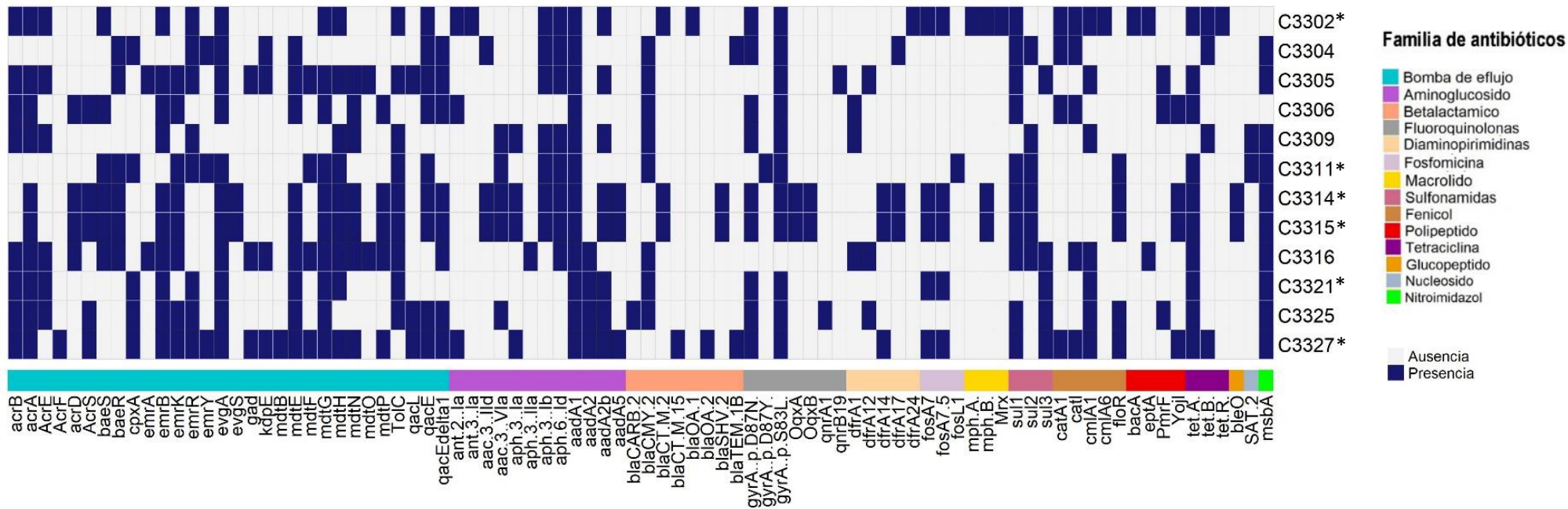
confieren resistencia a tetraciclina, cloranfenicol y aminoglucósidos. El análisis de cada entorno fue identificado en contigs con características de ser extracromosómicos.



**Figura 12. Representación de los entornos genéticos de *fosA7.5* y *fosL* localizados extracromosomalmente en *E. coli* aisladas de cárnicos.** Azul marino: proteínas hipotéticas. Los genes se muestran como flechas con la dirección de transcripción indicada por la punta de flecha y el nombre del mismo en la parte superior. La localización sobre el elemento extracromosómico está indicada en la línea inferior.

Mediante ResFinder 4.1, el análisis *in silico* también permitió identificar los genes de resistencia a antibióticos en las 12 cepas secuenciadas. Se identificaron 85 de genes de los cuales 12 se encuentran asociados a la resistencia a aminoglucósidos; 8 a  $\beta$ -lactámicos; 7 fluoroquinolonas; 5 a diaminopirimidinas; 4 a polipéptidos, 3 a sulfonamidas, fosfomicina y macrólidos, respectivamente; 2 a fenicoles y 1 a nucleósidos, glucopeptidos y nitroimidazol, respectivamente, el resto de los genes fueron asociados a bombas de eflujo (figura 13).

En las 12 cepas secuenciadas se realizó la búsqueda de genes asociados a conferir resistencia a colistina, sin embargo, el resultado fue negativo para cada una de ellas.



**Figura 13. Genes de resistencia a antibióticos identificados en las cepas secuenciadas de *E. coli* aisladas de cárnicos.** Los recuadros en color azul indican presencia, los recuadros en colores claros indican ausencia del gen. \*: cepas secuenciadas por tecnología Illumina y Nanopore.

**Tabla 19. Características identificadas en las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos.**

CEPA	Origen	Resistotipo (COL/FOS)	Gen fos	Caracterización plasmídica					
				Número: tamaño (kb)	Grupos de incompatibilidad	Relaxasa	Sistemas de adicción	Sec. Inserción	Transposones
C2339	Cerdo	FOS	<i>fosA7</i>	2: 437, 137	FIB, FIC, FII, I1, N, Y, P, OricolE	F12, F11, P12, C12	CcdAB, VagCD, Hok-sok, SrnBC	IS26	ND
C3302	Cerdo	FOS	<i>fosA7.5</i>	2: 121, 71	FIB, FIC, FII, HI2. N, Y, FD	F12	Hok-sok	IS26, ISEcp1	-
C3308	Cerdo	-	-	4: 110, 104, 71, 51	FIB, FII, I1, N, A/C, OricolE, OricolETP	F12, P12, P51, H121	CcdAB, VagCD, PndCA, SrnBC	IS26, ISEcp1	ND
C3309	Cerdo	-	-	3: 179, 121, 104	FIB, FIC, I1, K, B/O	F12	VagCD, Hok-sok, SrnBC	IS26, ISEcp1	Tn6082
C3312	Cerdo	COL	-	1: 106	K, OricolE, OricolETP	P51	NI	IS26, ISEcp1	ND
C3316	Cerdo	-	-	2: 185, 88	FIB, FII, FD, HI2	P51	Hok-sok	NI	Tn6082
C2336	Pollo	FOS	<i>fosL1</i>	5: 193, 168, 151, 99, 60	FIB, FII, I1, P, K, OricolE	F12, P11, P12, P51, P53	VagCD, Hok-sok, PndCA, SrnBC	IS26	ND
C2337	Pollo	FOS	<i>fosA7</i>	4: 293, 223, 98, 86	FIB, FIC, FII, I1, N, W, Y, P, T, OricolE	F12, F11, P12, P51, C12	CcdAB, VagCD, Hok-sok, SrnBC	IS26	ND
C2338	Pollo	-	-	5: 168, 121, 114, 86, 59	FIB, FII, I1, Y, K, OricolETP	F12, P11, P12, P53	VagCD, Hok-sok, PndCA	IS26, ISEcp1	ND
C3297	Pollo	FOS	<i>fosL1</i>	2: 437, 139	FIB, FIC, FII, I1, W, Y, P, T, OricolE	F12, F11, P12, P51, C12	VagCD, Hok-sok, PndCA, SrnBC	IS26	ND
C3298	Pollo	FOS	<i>fosA7</i>	3: 357, 179, 94	FIB, FIC, FII, I1, N, Y, P, OricolE	F12, P51	VagCD, Hok-sok, SrnBC	IS26, ISEcp1	ND
C3299	Pollo	-	-	3: 233, 150, 117	FIB, FII, B/O, A/C, OricolE	F12, P51, H121	CcdAB, RelBE, VagCD, SrnBC	IS26, ISEcp1	ND
C3300	Pollo	-	-	4: 378, 98, 62, 20	Frep	F12	VagCD, Hok-sok	IS26	ND
C3303	Pollo	-	-	4: 339, 103, 95, 88	FII, I1, K, OricolETP	F12, P12, P51, P53, H11	CcdAB, VagCD, PndCA	IS26, ISEcp1	ND

C3304	Pollo	-	-	5: 212, 181, 158, 68, 52	FIA, FIB, Y, P, K, B/O	F12	CcdAB, VagCD	ISEcp1	-
C3305	Pollo	-	-	2: 156, 100	FII, II. HI2	F12	CcdAB, Hok-sok	IS26, ISEcp1	Tn6082
C3306	Pollo	FOS	-	4: 272, 254, 135, 20	FIA, FIB, FIC, II, K, B/O	P53	CcdAB, VagCD, SrnBC	NI	-
C3307	Pollo	-	-	5: 184, 97, 25, 23, 20	FIB, FII, II, B/O, OricolE, OricolETP	F12, P3, P12, P51	CcdAB, VagCD, PndCA, SrnBC	NI	ND
C3310	Pollo	COL	-	1: 49	K, OricolETP	P51, C12	NI	IS26, ISEcp1	ND
C3311	Pollo	FOS	<i>fosL1</i>	1: 106	FIB, FII, A/C	F12, P53	CcdAB, Hok-sok, SrnBC	IS26, ISEcp1	-
C3313	Pollo	-	-	4: 197, 104, 92, 17	FIB, FII, FD	F12	PemKI, CcdAB, VagCD, Hok-sok, SrnBC	IS26, ISEcp1	ND
C3314	Pollo	FOS	<i>fosA7.5</i>	3: 197, 103, 95	FIB, FIC, FII, II, HI2, X, N, Y, P, T, B/O	F11, P12, P51, C12	Hok-sok	ISEcp1	Tn6196
C3315	Pollo	FOS	<i>fosA7.5</i>	3: 196, 99, 62	FIB, FII, HI2, X, N, P, OricolE, OricolETP	F12, H11, C12	Hok-sok	ISEcp1	Tn6196
C3317	Pollo	-	-	3: 314, 166, 122	FIB, FIC, N	P3, P51	VagCD, Hok-sok, SrnBC	IS26, ISEcp1	ND
C3318	Pollo	-	-	2: 119, 62	FIB, FII, HI2, Y, OricolE	F12, P51, H11	CcdAB, Hok-sok, SrnBC	IS26	ND
C3319	Pollo	FOS	<i>fosA7</i>	3: 122, 90, 61	HI2	F12, P3	Hok-sok	IS26, ISEcp1	ND
C3320	Pollo	FOS	<i>fosA7</i>	5: 287, 218, 177, 61, 41	Frep	F12	VagCD	IS26, ISEcp1	ND
C3321	Pollo	FOS	<i>fosA7.5</i>	1:_ 103	FIB, FII, II, X, OricolE	P51	VagCD, Hok-sok, SrnBC	ISEcp1	Tn6196
C3322	Pollo	FOS	-	2: 141, 20	FIB, FII, II. N, K, A/C, OricolE, OricolETP	F12, P12, P51, P53, H121	CcdAB, VagCD, Hok-sok, PndCA	IS26, ISEcp1	ND
C3323	Pollo	FOS	-	2: 92, 54	FIB, FII, II. N, A/C, OricolE, OricolETP	F12, P51, H121	SrnBC	IS26, ISEcp1	ND

C3324	Pollo	FOS	<i>fosA7</i>	4: 261, 122, 100, 19	FIB, FII, I1. B/O, OricolETP	F12, P12, P51	PndCA	IS26, ISEcp1	ND
C3325	Pollo	-	-	4: 167, 112, 90, 39	FIB, FII, I1, X. N, B/O	F12	VagCD, Hok-sok	ISEcp1	-
C3326	Pollo	-	-	1: 90	I1, Y, A/C	H121	NI	IS26, ISEcp1	ND
C3327	Pollo	FOS	<i>fosA7.5</i>	3: 173, 91, 39	FIB, FII, FD, X, N, OricolE, OricolETP	F12	Hok-sok	ISEcp1	Tn6196
C3328	Pollo	-	-	2: 21, 16	FIB, FII, I1, K, OricolE, OricolETP	P11, P53	PemKI, VagCD, Hok-sok, PndCA	IS26, ISEcp1	ND
C3329	Pollo	-	-	4: 396, 95, 88, 60	FIB, FII, FD, N, OricolE, OricolETP	P53	CcdAB, Hok-sok, SrnBC	IS26, ISEcp1	ND
C3330	Pollo	-	-	4: 192, 165, 122, 100	I1	F12	NI	IS26, ISEcp1	ND
C4424	Pollo	FOS	<i>fosA7</i>	1: 55	FIA	SIN PRESENCIA	PemKI, CcdAB, VagCD, SrnBC	IS26, ISEcp1	ND

En naranja se muestran las cepas secuenciadas. ND: No determinado. NI: No identificada. FOS: fosfomicina. COL: colistina

## 8. DISCUSIÓN

Una de las principales problemáticas que ha comprometido la salud pública, es la resistencia bacteriana a antibióticos; sin embargo, la seguridad alimentaria también se ha visto comprometida, así como la alimentación animal y producción ganadera (Fayemi *et al.*, 2021), dejando en claro la importancia de la cadena alimentaria, y el manejo adecuado de animales destinados a consumo y de alimentos vendidos al mayoreo y menudeo (Madec & Haenni, 2018; Darphorn *et al.*, 2021; Rega *et al.*, 2021).

Aunque el uso de antibióticos en animales generadores de alimentos es variado, su utilización por su efecto en la mejora del rendimiento del crecimiento en animales es uno de los usos que compromete la eficacia de los antibióticos (Vega *et al.*, 2020; Rega *et al.*, 2021), debido al uso frecuente de pequeñas dosis de antimicrobianos añadidos al pienso animal.

Se han reportado cepas diarreogénicas de *E. coli* con altas tasas de resistencia antimicrobiana a grupos de antibióticos de primera línea, estas cepas se han identificado en pollos, cerdos y ganado, incluyendo su carne y productos derivados; además, varios estudios han señalado la posibilidad de un intercambio de estas cepas entre humanos y animales (Ranjbar *et al.*, 2017; Quino *et al.*, 2020; Malesa *et al.*, 2024; Zalewska *et al.*, 2024a).

La lucha contra *E. coli* MDR en el ámbito veterinario es una preocupación importante, ya que los antibióticos de última línea, como la colistina, se utiliza para tratar enfermedades infecciosas en animales de producción como cerdos, aves, conejos y terneros en países europeos y asiáticos, (Kempf *et al.*, 2016; Zingali *et al.*, 2020; Jansen *et al.*, 2022) y en países latinoamericanos como México (Calero-Cáceres & Balcázar, 2023).

En este trabajo se buscó analizar uno de los mecanismos con mayor relevancia respecto a la resistencia reportada frente a colistina, el cual al ser mediado por plásmidos ha sido identificado en cepas de *E. coli* de diferentes orígenes (Majewski *et al.*, 2021, Jansen *et al.*, 2022). Particularmente la diversidad y los mecanismos de transmisión del gen *mcr-1* que proporciona resistencia a colistina en cepas que pueden ser transferidas entre animales y humanos, es una amenaza para la salud mundial. Shafiq y colaboradores, reportaron la identificación del gen *mcr-1* y *bla<sub>CTX-M</sub>* en un 73% de muestras tomadas de pollos de engorde, además, identificaron la prevalencia de *ISEcp1*, *ISCR1*, *ISAp11* e *int1* del 27.77%, 53.70%,

51.85% y 70.37% respectivamente, informando sobre cepas de *E. coli* MDR con múltiples elementos genéticos (Shafiq *et al.*, 2021). En este estudio no se identificó el gen *mcr-1* en las dos cepas de *E. coli* que fueron resistentes a colistina; sin embargo, aunque la búsqueda de dicho gen fue con base en los antecedentes y lo reportado por otros estudios, no se puede descartar la presencia de alguna otra variante del gen *mcr* no buscada en este estudio, o de otro mecanismo que le proporcione resistencia como la modificación del lipopolisacárido a través de la adición de fosfoetanolamina, o mutaciones de los genes cromosómicos *phoPQ*, *pmrAB* o *mgrB* (Galindo-Méndez *et al.*, 2023).

En la actualidad, con la disminución de la disponibilidad de opciones terapéuticas contra algunos microorganismos MDR, los tratamientos han sido orientados al uso en la práctica clínica de antibióticos antiguos, como la fosfomicina.

El uso de la fosfomicina en entornos veterinarios está prohibido en China y algunos países europeos por la propagación de genes de resistencia y plásmidos epidémicos en animales destinados a consumo humano, mientras que, en regiones de América Central y del Sur, se administra en pollos de engorde y cerdos enfermos (Mattioni *et al.*, 2023). La tasa de susceptibilidad a dicho antibiótico ha sido reportada en mayor porcentaje en los aislados humanos (94%) que en los aislados porcinos (77%) (Tseng *et al.*, 2015); sin embargo, se ha identificado la adquisición de metaloenzimas FosA como uno de los mecanismos de resistencia más frecuente en cepas provenientes de pollos de engorde, mientras que, en cepas clínicas de *E. coli* se han descrito todos los mecanismos de resistencia a fosfomicina, tales como las mutaciones de los transportadores de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y glucosa 6-fosfato (G6P) (Mattioni *et al.*, 2023).

Las mutaciones del transportador de G6P, UhpT, es uno de los mecanismos más estudiados, Sorlozano-Puerto y colaboradores (Sorlozano-Puerto *et al.*, 2020) apoyan la hipótesis de que la resistencia a la fosfomicina en *E. coli* se atribuye con mayor frecuencia al bloqueo de la vía de entrada del antibiótico debido principalmente a modificaciones en el transportador UhpT, ya que todos sus aislamientos resistentes analizados fueron defectuosos en dicho transporte; sin embargo, las cepas C3304 y C3325 estudiadas en este trabajo, albergaron la mutación del transportador UhpT (tabla 18) y ninguna de las dos presentó fenotipo de resistencia a fosfomicina. En el mismo estudio, Sorlozano-Puerto y colaboradores

concluyeron que no es posible afirmar que las sustituciones de aminoácidos en la enzima adenilato ciclasa (CyaA) contribuyen a la resistencia a fosfomicina en los aislamientos clínicos de *E. coli*; sin embargo, existe una implicación relevante de la actividad de CyaA en la expresión de GlpT y UhpT (Mattioni *et al.*, 2023), debido a que los transportadores GlpT y UhpT son inducidos por la presencia de G3P y G6P, respectivamente, y requieren altos niveles de AMP cíclico (cAMP), cuya síntesis depende de la CyaA; la mutación identificada en CyaA en este estudio (Ser352Thr) (tabla 18), también se identificó en otros reportes junto con Asn142Ser, Gly222Ser, Ala349Glu, Thr840Ala, Ser356Leu, Ala363Ser, His716Leu y Ser142Asn, asociándose con una susceptibilidad reducida a fosfomicina (Ohkoshi, *et al.*, 2017; Sorlozano-Puerto *et al.*, 2020), lo cual corresponde con los hallazgos obtenidos en este estudio mediante secuenciación, ya que se identificó dicha mutación en cinco de las doce cepas secuenciadas, de las cuales, cuatro presentaron una CMI  $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$ , mientras que la cepa C3304 a pesar de contar con la mutación en el transportador UhpT y en CyaA, no presentó fenotipo de resistencia a fosfomicina (tabla 18).

En contraste con Ohkoshi y colaboradores (Ohkoshi, *et al.*, 2017), donde encontraron que la actividad modificada de UhpT es más dominante que la de GlpT en cepas con susceptibilidad disminuida a fosfomicina; en este estudio, de las 12 cepas secuenciadas, en 9 se identificó la mutación de GlpT (Glu448Lys) (tabla 18) las cuales presentaron una MIC=  $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$ , mientras que la mutación de UhpT (Glu350Gln) únicamente se identificó en 2 cepas y ninguna presentó resistencia a fosfomicina (tabla 18).

Pese a que la alteración de la actividad de GlpT y UhpT junto con las mutaciones en MurA se consideran los principales mecanismos de resistencia a fosfomicina, son seguidos del deterioro de la actividad de CyaA (Mattioni *et al.*, 2023)

En nuestro estudio, una de las limitaciones fue centrarse en los determinantes de resistencia a fosfomicina mediados por plásmidos, los cuales se han relacionado con la transmisión rápida de dicha resistencia por lo que, no se investigaron otros mecanismos cromosómicos *in vitro*; sin embargo, el análisis *in silico* mostró la posibilidad de que la resistencia pueda atribuirse a más de un mecanismo.

Los genes *fosA* se distribuyen cromosómicamente en *Providencia spp* y *Serratia marcescens* (*fosA*), en *Enterobacter spp* (*fosA2*), en especies de *Salmonella* (*fosA7*), en *Klebsiella*

*pneumoniae* (*fosA5* y *fosA6*) y en *Leclercia adecarboxylata* (*fosA8*); sin embargo, algunos genes *fosA* se encuentran principalmente en plásmidos conjugativos, particularmente, en *E. coli*, lo que conduce a un alto nivel de resistencia a la fosfomicina (Kieffer *et al.*, 2020). La diseminación mediada por plásmidos para *fosA3*, *fosA4*, *fosA8*, *fosA9* y *fosA10* ha sido identificada entre cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, siendo *fosA3* la variante más extendida tanto en entornos veterinarios como clínicos, no obstante, *fosA7* también ha sido identificada predominantemente en aislamientos de entornos veterinarios (Mattioni *et al.*, 2023).

Debido a que los genes que codifican enzimas que inactivan la fosfomicina pueden ser transferibles por plásmidos o transposones, se han convertido en un problema grave en diferentes partes de mundo. Algunos estudios revelaron que genes como *fosA3* y *bla<sub>CTX-M</sub>* estaban coalbergados en plásmidos conjugativos y se encuentran flanqueados por *IS26*, conteniendo un replicón de tipo IncN (Tseng *et al.*, 2015).

Con base en ello y la previa identificación de *bla<sub>CTX-M</sub>*, el gen *fosA3* se consideró como una de las variantes a buscar gracias a informes sobre su diseminación entre animales que se incluyen en la cadena alimentaria (Mattioni *et al.*, 2023), sin embargo, *fosA3* no se indentificó en ninguna de las cepas de este estudio.

Mediante al análisis *in silico*, la variante *fosA7.5* se identificó en cinco cepas, cuatro de ellas originarias de pollo y una de origen porcino, las cinco cepas presentaron una CMI  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$ ; posteriormente mediante PCR, *fosA7* se identificó en siete cepas más, seis de ellas de origen de pollo y una de origen de cerdo, aunque no fue posible identificar alguna variante de dicho gen, las siete cepas presentaron una CMI  $\geq 512$   $\mu\text{g/mL}$ , lo cual podría sugerir que la presencia de *fosA7* confiere una elevada CMI a fosfomicina, ya que existen estudios que han reportado la expresión de *fosA7* con un alto valor de la CMI a fosfomicina ( $> 512$   $\mu\text{g/mL}$ ) (Mattioni *et al.*, 2023). Pese a que las variantes de *fosA7* se han reportado con una ubicación cromosómica entre diferentes especies bacterianas, *fosA7.5* y *fosA7.9* han sido estrictamente ligados al cromosoma de *E. coli* y *C. freundii*, respectivamente, sin embargo tras el análisis bioinformático, este es uno de los primeros estudios en identificar al gen *fosA7.5* en plásmidos, describiendo entornos genéticos donde se identificaron las secuencias de inserción *IS15* y transposones de la familia Tn3 (figura 12), lo cual contrasta con lo reportado por Mattioni y colaboradores (Mattioni *et al.*, 2023), ya que describen en el entorno de

*fosA7.5* en *E. coli* un transposón flanqueado por elementos *ISL3* e *IS3* (*IS911* e *ISEC52*). El hallazgo de la identificación de *IS15* es relevante por la posibilidad de que las secuencias flanqueadas por dos elementos *IS* idénticos y correctamente orientados, pueden movilizarse y diseminarse en diferentes cepas, incluso en aquellas que no se encuentren relacionadas (Vandecraen *et al.*, 2017), además su localización extracromosómica puede estar relacionada con la distribución geográfica de las cepas, al recibir diferentes presiones de selección.

Cabe destacar que en todas las cepas de estudio a las que se les identificó el gen *fosA7.5* mediante secuenciación, también presentaron mutaciones en la secuencia de aminoácidos de GlpT, por lo que nuevamente se recalca la posibilidad de que la resistencia pueda atribuirse a más de un mecanismo.

En cuanto a FosL1, es una nueva metaloenzima glutatión-transferasa que se ha asociado a inducir un perfil de resistencia a fosfomicina a un nivel alto (CMI = 1,024 µg/ml) (Kieffer *et al.*, 2020). En el presente estudio, el gen *fosL* se identificó previamente *in silico* en la cepa C3311, la cual presentó una CMI de 512 µg/ml; con base en la búsqueda *in vitro*, las cepas C2336 y C3297 presentaron el gen *fosL*, con una CMI de 1024 y 512 µg/ml respectivamente, resultados que concuerdan con lo publicado por Kieffer y colaboradores (Kieffer *et al.*, 2020), ya que, aunque las CMI de las tres cepas no fue de 1024 µg/ml, presentaron CMI elevadas (tabla 14).

El entorno genómico que rodea a *fosL1* se ha identificado en plásmidos y ha sido descrito con un casete flanqueado en ambos lados por un elemento similar a *IS91* junto con transposones tipo Tn7 (Kieffer *et al.*, 2020; Mattioni *et al.*, 2023); sin embargo, en este estudio ninguno de estos elementos fue identificado en el entorno del gen *fosL1* de la cepa C3311 (figura 12), pero se localizó *ISVsa5*, una secuencia perteneciente a la familia *IS4* que ha sido identificada en entornos de genes como *tetC*, *tet(B)*, *tetR*, *strA*, *strB* y *sul2* (Partridge *et al.*, 2021; He *et al.*, 2024), pero hasta el momento no ha sido descrita en entornos similares, siendo este trabajo el primero en hacerlo. Además, aunque el gen *fosL1* se describió por primera vez en un plásmido IncX1 conjugativo en una cepa de *E. coli* (Kieffer *et al.*, 2020; Mattioni *et al.*, 2023), por el análisis *in silico*, sólo se identificó al gen *fosL1* de forma extracromosómica, pero no se identificó ningún tipo de replicón, por lo que, en contraste con lo reportado, no fue posible asociarlo a algún tipo de plásmido.

Si bien, el uso inadecuado de antibióticos ha promovido la aparición de cepas MDR, la administración continua de antibióticos en animales, ya sea con fines de profilaxis o promoción del crecimiento, ha llevado a la selección de cepas resistentes que pueden diseminarse a los humanos a través de la cadena alimentaria.

En el caso particular de colistina, en Egipto se han reportado cepas de *E. coli* proveniente de pollo que transportaban *mcr-1* e incluso también albergaba *fosA4*, demostrando la coexistencia de ambos genes en plásmidos (Ramadan *et al.*, 2021), sin embargo, ninguna de las cepas de este estudio mostró resistencia a ambos antibióticos. Cabe destacar que pese a no ser identificado el gen *mcr-1* en las cepas C3310 (pollo) y C3312 (cerdo), ambas poseían un perfil plásmidico similar a pesar de provenir de diferentes orígenes.

Hasta el momento, existe poca información sobre los elementos genéticos completamente caracterizados en aislamientos de *E. coli* de carne de cerdo y pollo, aunque se ha registrado evidencia de intercambio de genes entre cepas de *E. coli* aisladas a partir de alimentos y muestras clínicas (Balbuena-Alonso *et al.*, 2022; Zalewska *et al.*, 2024a), los plásmidos han sido los elementos genéticos móviles con mayor espectro de hospedadores al encontrarse en diferentes microorganismos aislados de diferentes fuentes como alimentos, animales destinados al consumo y muestras clínicas (Carbonari *et al.*, 2022).

Particularmente en cerdos y alimentos vendidos al menudeo, se han descrito numerosas familias de plásmidos, pero los pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncF (IncFIB e IncFII), IncI1 e IncHI2 han sido los que se reportan con mayor frecuencia como proveedores de genes de resistencia a antibióticos (Zingali *et al.*, 2020; Darphorn *et al.*, 2021; Ramadan *et al.*, 2021); esto concuerda con lo identificado en este estudio, ya que en el total de cepas, tanto IncFIB como IncFII fueron los replicones encontrados con mayor frecuencia, 68% y 66% respectivamente. Sin embargo, un desafío importante en la tipificación de replicones son los plásmidos multirreplicones. El plásmido multirreplicón más conocido es el propio IncF, que puede llevar un replicón FII, FIA y/o FIB, lo cual dificulta la tipificación y por ende su comprensión epidemiológica respecto al acarreo de genes de resistencia a antibióticos, lo que termina requiriendo pruebas adicionales para distinguir entre múltiples plásmidos presentes en el microorganismo (Rozwandowicz *et al.*, 2018). El análisis de la cantidad de plásmidos con respecto a su caracterización, sugiere que más de una cepa pueda

contar con plásmidos portadores de multirreplicones, debido a que el mayor número de plásmidos identificados por PFGE fue cuatro y cinco en cepas como C3308 y C3320 (tabla 15), mientras que la identificación de sus replicones fue de siete y uno, respectivamente, esto sugiere la posibilidad de un multirreplicón en las cepas que superan el número de replicones respecto al número de plásmidos identificados por PFGE, como todas las cepas provenientes de cerdo y las cepas C2336, C2337, C2338, C3297, C3298, C3299, C3304, C3305, C3306, C3307, C3311, C3314, C3315, C3318, C3321, C3322, C3323, C3324, C3325, C3327, C3328 y C3329 provenientes de pollo.

Considerando la asociación observada entre algunos replicones respecto a transferir determinados genes de resistencia, en cepas resistentes a fosfomicina aisladas de cerdos, se ha identificado el gen *fosA3* reportado en los replicones IncFIB, IncN, IncP e IncFrepB, (Tseng *et al.*, 2015); sin embargo, a pesar de no identificar el gen *fosA3* en ninguna de las cepas de estudio, los replicones anteriormente mencionados, fueron identificados con una frecuencia de 68%, 34%, 21% y 5% respectivamente, por lo que, no se puede descartar la posibilidad de que en un futuro, las cepas con dichos replicones, puedan adquirir y acarrear al gen *fosA3*.

Aunado a ello, se ha reportado que los plásmidos IncI1 e IncHI2 identificados en aislamientos de *E. coli* de carne y de animales productores de alimentos portan genes de resistencia a antibióticos como *aadA*, *dfrA17*, *sul2*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M/oqxAB</sub>* con *aac(6')-Ib-cr*, *floR*, *rmtB*, *mcr-1* y *fosA3* (Zingali *et al.*, 2020; Darphorn *et al.*, 2021; Zalewska *et al.*, 2024b), por lo que la identificación de ambos plásmidos tanto en las cepas provenientes de cerdo, como las de pollo, es importante al ser EGM circulando en alimentos, teniendo la capacidad de portar genes que codifiquen resistencia a antibióticos clínicamente importantes (Zingali *et al.*, 2020).

Por otro lado, a pesar de que los plásmidos se clasifican generalmente por grupo de incompatibilidad, la región conservada de dichos plásmidos también alberga sistemas de mantenimiento como los genes implicados en la partición (Darphorn *et al.*, 2021). Los sistemas de adicción permiten que los plásmidos sean estables en su hospedero bacteriano, influyendo en su éxito para su mantenimiento, independientemente de la resistencia a los antibióticos (Carattoli *et al.*, 2011).

La falta de un sistema de partición o estabilidad conduce a un alto número de copias, lo que evita la pérdida de plásmidos (Rozwandowicz *et al.*, 2018), esto garantiza la permanencia de los plásmidos tanto en la célula como en su progenie, por lo que, la identificación en este estudio de al menos un sistema de adicción plasmídica en el 89% (34/38) de las cepas, es un hallazgo importante, ya que puede asegurar el mantenimiento de los plásmidos, lo cual concuerda con lo reportado por Darphorn y colaboradores, dónde identificaron al menos un sistema de adicción plasmídica en el 94% de *E. coli* aisladas de carne (Darthorn *et al.*, 2021); a pesar de ello, uno de los sistemas representados con mayor frecuencia en cerdos y aves es Hok-sok y en menor frecuencia VagCD (Yang *et al.*, 2015), lo cual difiere con los resultados de este estudio al ser VagCD el sistema identificado con mayor frecuencia.

Sin embargo, a pesar de la permanencia que podría garantizar dichos sistemas de adicción, se considera que los plásmidos de menor tamaño tienen mayor probabilidad de conducir a un alto número de copias (Balbuena-Alonso *et al.*, 2022).

Existen reportes de *E. coli* aislada de aguas residuales donde identificaron plásmidos que variaron entre 1,5 a 15 kb (Akter *et al.*, 2021), en cepas clínicas desde 6 kb hasta 191 kb (Bethke *et al.*, 2020), mientras que en cepas aisladas de carne se han reportado tamaños de 70 a 194 kb (Yang *et al.*, 2015; Darphorn *et al.*, 2021). Además, se reporta una variedad de plásmidos (1–5 plásmidos), junto con los replicones IncII, IncFII, IncFIB e IncX identificados con mayor frecuencia (Darthorn *et al.*, 2022), siendo los plásmidos IncF los de mayor variabilidad en tamaño (50–200 kb) (Yang *et al.*, 2015). En nuestro estudio, de acuerdo a lo mostrado en la tabla 15 y las figuras 4 y 5, el tamaño de plásmidos identificados tuvo una gran variación (10–450 kb), lo cual, aunque coincide con los rangos reportados en otros estudios, supera el tamaño máximo, sin embargo, de acuerdo a Balbuena-Alonso y colaboradores, se han identificado plásmidos de cepas alimentarias de menos de 500 kb con un rango de tamaños muy amplio (1.1 kb - 404 kb) (Balbuena-Alonso *et al.*, 2022), por lo que los plásmidos identificados en este estudio pueden no sólo coincidir con los de cepas clínicas, sino que podemos sugerir que se trate de megaplásmidos, los cuales pueden brindar a *E. coli* de origen cárnico beneficios adaptativos o evolutivos (Hall *et al.*, 2022).

No obstante, el tamaño de los plásmidos puede influir en una propagación eficiente en la THG, ya que casi todos los plásmidos conjugativos poseen un tamaño superior a 25 kb

además de que suelen tener un bajo número de copias (Balbuena-Alonso *et al.*, 2022), mientras que aquellos más pequeños tienden a tener un número alto de copias y no suelen ser conjugativos, tal es el caso de plásmidos ColE1 (Hall *et al.*, 2022), presente en el 37% (14/38) de las cepas de estudio.

Tomando en cuenta que los plásmidos se clasifican generalmente por grupo de incompatibilidad, y algunos pueden ser conjugativos, se han reportado estudios donde las familias de los plásmidos IncI, IncF e IncX cuentan con la maquinaria de conjugación (Darphorn *et al.*, 2022). En este estudio mediante el análisis bioinformático de genomas y con base en la resistencia a fosfomicina, en los plásmidos de las cepas C3302, C3321 y C3327 se identificaron elementos de la maquinaria de conjugación, tales como T4SS, T4CP, *oriT* y relaxasas; también a su vez, dichos plásmidos fueron identificados como IncFIB, IncFII, IncII e IncN; sin embargo, el análisis *in silico* de los plásmidos que portaban el gen *fosA* o *fosL* sólo sugiere la posibilidad de que pueden tener capacidad conjugativa, no obstante, debe ser confirmado mediante ensayos *in vitro*.

Por otra parte, la presencia de relaxasas ha permitido el establecimiento de otro sistema de clasificación para plásmidos. La tipificación de la relaxasa MOB, se centra en la proteína que corta un *oriT* para iniciar la transferencia conjugativa (Bethke *et al.*, 2020). En plásmidos obtenidos de *E. coli* aisladas de alimentos, las relaxasas MOB-F, MOB-P y MOB-H han sido reportadas con mayor frecuencia (Balbuena-Alonso *et al.*, 2022), mientras que en cepas clínicas se ha identificado MOB-F y MOB-P (Bethke *et al.*, 2020); esto coincide con las relaxasas identificadas con mayor frecuencia en este estudio, que fueron MOB-F y MOB-P las cuales corresponden a plásmidos IncF, IncN, ColE1 e IncII (Rozwandowicz *et al.*, 2018).

A pesar de que los genes de resistencia a antibióticos de diferentes familias son frecuentemente relacionados con plásmidos, también se han asociado a otros elementos móviles, como las secuencias de inserción y los transposones, los cuales facilitan la THG (Zalewska *et al.*, 2024a).

Hasta el momento se han descrito diversos casos en los que los elementos *IS* afectan la transferencia de la resistencia a los antibióticos (Vandecraen *et al.*, 2017), particularmente secuencias de inserción como *ISEcp1* e *IS26*, que contribuyen a la diseminación de las regiones que contienen los genes *bla<sub>CTX-M-1</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* entre cepas provenientes de humanos

y animales (Wang *et al.*, 2015). Además, *IS26* ha sido identificada en una gran diversidad de plásmidos que albergan genes de resistencia a los antibióticos, sugiriendo que los plásmidos desempeñan una función importante en la propagación de determinantes de resistencia en cepas de diferentes nichos, incluyendo productos cárnicos (Pan *et al.*, 2021; Malesa *et al.*, 2024). De igual modo, *ISEcp1* se ha detectado en aislados clínicos y en aislados de animales tanto para producción de alimentos como animales sanos o enfermos, incluidos cerdos y aves (Pérez-Etayo *et al.*, 2018). Considerando la alta prevalencia de reportes respecto a la presencia simultánea de ambas secuencias, contrasta con lo encontrado en las cepas C2339 y C3297, que únicamente presentan *IS26* y que presentaron un perfil plasmídico similar, contando con dos plásmidos de tamaños casi iguales y caracterización plasmídica similar pese a ser de orígenes distintos; mientras que para *ISEcp1*, las cepas C3314, C3315 y C3327, compartieron un perfil plasmídico similar además de provenir de pollo; por otro lado, la coexistencia de ambas secuencias tuvo la prevalencia más alta al identificarse en el 60% (23/38) de las cepas de estudio, lo cual concuerda con lo reportado por Pérez-Etayo y colaboradores, que describen cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de productos alimentarios, granjas y otros nichos, mostraron que *ISEcp1* se presenta en coexistencia con *IS26* (Pérez-Etayo *et al.*, 2018).

Por otro lado, se ha reportado que los genes *fosA* han sido identificados en aislados de alimentos minoristas, con una localización adyacente a *IS26* (Ramadan *et al.*, 2021), en este estudio, ocho cepas compartieron la identificación de genes *fosA* e *IS26*, sin embargo no se localizó *IS26* adyacente a ningún entorno de *fosA7* (figura 12, cepa C3302); a pesar de ello, no se puede descartar la posibilidad de que forme parte del entorno de alguna otra de las siete cepas no secuenciadas.

Finalmente, otro de los elementos identificados fueron transposones de la familia Tn3, encontrados en más del 50% de las cepas secuenciadas tanto originarias de pollo como de cerdo, lo cual es relevante al ser uno de los elementos genéticos móviles más importantes con la capacidad de propagar una gran variedad de genes de resistencia a antibióticos, incluidos los que confieren resistencia a diversas clases de antibióticos como  $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y colistina, a su vez son un grupo ampliamente extendido entre bacterias y

contienen una amplia variedad de genes que movilizan, incluidos, sistemas toxina-antitoxina (Nicolas *et al.*, 2015; Aghamohammad *et al.*, 2023; Tang *et al.*, 2024),

Tn6196 y Tn5403 han sido identificados junto con replicones IncFIB, IncFII e IncR en cepas clínicas de *K. pneumoniae* resistentes a  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos y fosfomicina (Costantino *et al.*, 2024); además ambos transposones también han sido asociados con replicones IncHI2 e IncN con una alta prevalencia en aislamientos zoonóticos de *Salmonella entérica* (Johansson *et al.*, 2021), por lo tanto, es posible sugerir la movilización de elementos de la familia Tn3 incluso entre diferentes géneros bacterianos y diferentes nichos.

Particularmente en *E. coli* resistente a antibióticos aislada de muestras de aves de corral y carne de cerdo se ha identificado Tn6196 (Malesa *et al.*, 2024; Zalewska *et al.*, 2024b); sin embargo en este estudio las cepas C3309 y C3316 que son originarias de carne de cerdo, no presentaron dicho transposón, sino Tn6082, no obstante, las cepas originarias de pollo C3314, C3315 y C3327 si presentaron Tn6196, mientras que la cepa C3321 presentó Tn5403, el cual ha sido identificado en patotipos UPEC (Sung *et al.*, 2024), lo cual nuevamente señala que a pesar del nicho del que provenga *E. coli*, puede ser reservorio de elementos como transposones que porten genes de resistencia.

El riesgo de la propagación de genes de resistencia a antibióticos en cepas provenientes de la cadena alimentaria es potenciado por la presencia de plásmidos portadores de dichos genes en cepas MDR de *E. coli*, de las cuales se ha reportado su capacidad de transferir resistencia entre bacterias de humanos y pollos (Zalewska *et al.*, 2024a).

La identificación y caracterización de los plásmidos junto con su asociación con diferentes cepas bacterianas proporciona un conocimiento significativo para comprender la epidemiología y la propagación de la resistencia a los antibióticos (Thapa *et al.*, 2020; Zalewska *et al.*, 2024b).

Los perfiles de plásmidos han resultado ser útiles tanto en el rastreo de la resistencia a los antibióticos como en la vigilancia de brotes epidémicos (Thapa *et al.*, 2020). Considerando su relevancia para el estudio de cepas bacterianas, la correlación entre la prevalencia de STEC

y otros patotipos de *E. coli* en reservorios y fuentes de infección aún no ha sido lo suficientemente estudiada a nivel molecular en México.

Un factor determinante que ha facilitado la transmisión de STEC tanto en personas como en animales es la cadena alimentaria, aunque inicialmente se relacionó con la carne de vacuno, (Rípodas *et al.*, 2017), uno de los reservorios más importantes de STEC son los cerdos; cuando estas cepas STEC ingresan a la cadena alimentaria se favorece el riesgo y complicaciones por adquirir dicho patotipo (Colello *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la toxina Shiga 1 y/o la toxina Shiga 2 son los principales rasgos de virulencia responsables de infecciones por STEC, sin embargo, las cepas que producen Stx2, son más virulentas que las cepas que producen solo Stx1 (Rivas *et al.*, 2023). En países como Chile y Argentina, han identificado *stx2* en muestras provenientes de cerdos (Galarce *et al.*, 2023). En Argentina cepas STEC *stx2* positivas, fueron aisladas de bovinos, en Noruega cepas *stx1* positivas se asociaron con un brote de diarrea en niños, mientras que en Brasil cepas *stx2* se asociaron a diarrea aguda en adultos (Carbonari *et al.*, 2022). Con base en los antecedentes descritos, en este estudio se realizó la búsqueda de los genes *stx1* y *stx2*, con el objetivo de asociar a las cepas de *E. coli* provenientes de cárnicos con uno de los patotipos mayormente reportados en alimentos; sin embargo, el resultado de la búsqueda fue negativo para todas las cepas de estudio, descartándolas como patotipo STEC. No obstante, no es posible descartar que dichas cepas no pertenezcan a algún otro patotipo, ya sea diarreogénico o no, así como tampoco se pueden considerar como cepas que no conlleven un riesgo a la salud.

Recientemente, algunos informes han indicado el surgimiento de cepas STEC resistentes a antibióticos y a su vez han sido asociadas con casos graves de infecciones y de brotes (Carbonari *et al.*, 2022), si bien las cepas de este estudio no fueron caracterizadas como STEC, si fueron caracterizadas como MDR, destacando su capacidad de resistencia a más de tres familias de antibióticos.

De acuerdo a un estudio realizado por Carbonari y colaboradores, los plásmidos IncB/O/K/Z, IncFIB, IncX4 e IncFII fueron identificados en cepas STEC O145, el cual es el segundo serogrupo mayormente asociado al SHU en países como Argentina que posee la tasa más alta de SHU a nivel mundial (70% de los casos asociados con infecciones por STEC) (Carbonari *et al.*, 2022), por lo que, pese a no ser identificado el patotipo STEC a través de la detección

de la toxina Stx y la búsqueda *in silico*, los plásmidos de los grupos de incompatibilidad mencionados si fueron identificados, destacando su importancia frente al seguimiento de perfil de resistencia, ya que estos pueden adquirirse por transferencia horizontal a través de plásmidos conjugativos entre diferentes bacterias entéricas.

Los antígenos O y H se han utilizado con mayor frecuencia en la serotipificación de *E. coli* patógena porque tienen la mejor correlación con los factores de virulencia (Torti *et al.*, 2021). Uno de los serogrupos de STEC no O157 más comunes en Europa, Estados Unidos y Argentina es el O103 (Torti *et al.*, 2021; Carbonari *et al.*, 2022; Rivas *et al.*, 2023), el cual fue identificado en la cepa C3321 a pesar de no ser un patotipo STEC, así como el serogrupo clínicamente importante O117 (Onyeka *et al.*, 2021; Vishram *et al.*, 2021), identificado en la cepa C3305. Aunado a ello, el antígeno H21 que ha sido reportado en cepas STEC aisladas de bovinos en Chile y Argentina (Bonino *et al.*, 2023; Galarce *et al.*, 2023), a su vez, el antígeno H34 también ha sido identificado en cepas STEC aisladas de bovinos en Argentina (Bonino *et al.*, 2023), el cual fue identificado en las cepas C3302 y C3304, mientras que la cepa C3311 presentó el antígeno H16, el cual ha sido identificado en cepas de *E. coli* aisladas de carne molida (Colello *et al.*, 2019). Además, en la cepa C3316 se identificó el secuenciotipo ST10, el cual pertenece a los linajes patogénicos extraintestinales globales y ha sido reportado en brotes de enfermedad en pollos de engorde (Bojesen *et al.*, 2022). Estos reportes muestran la gran variedad de serotipos a los que pueden pertenecer las cepas STEC, destacando la necesidad de un monitoreo y vigilancia de cepas STEC y no STEC, centrándose en sus características genómicas, por lo que debería establecerse una vigilancia oficial que pueda centrarse en la detección de determinantes moleculares de virulencia, así como de parentesco clonal, en toda la cadena de producción de carne.

En lo que respecta al resto de serotipos encontrados en este estudio, a pesar de no haber reportes epidemiológicos en hallazgos relevantes, no se puede descartar que en un futuro que sean relevantes ante algún brote o complicación clínica, no sólo como una caracterización antigénica, sino también desde la asociación a la epidemiología molecular de los genes de resistencia a antibióticos, evento que representa una tarea compleja debido al papel de los EGM en la diseminación de dichos genes, reconociéndose como un desafío importante para la seguridad alimentaria. Los métodos de tipificación molecular son útiles para establecer

relaciones clonales entre aislamientos de diferentes ambientes, con el fin de realizar investigaciones epidemiológicas; además, comprender el mecanismo molecular de la resistencia es importante para desarrollar nuevas opciones que permitan prevenir la propagación de elementos de resistencia entre bacterias aisladas de diferentes fuentes de infección, reservorios animales, cepas clínicas y alimentos.

## 9. CONCLUSIONES

1. Alimentos como la carne de cerdo y pollo representan reservorios potenciales de cepas de *E. coli* MDR.
2. El 47% de las cepas de *E. coli* estudiadas fueron resistentes a fosfomicina con una CMI elevada de  $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$ .
3. El gen *fosLI* identificado en la cepa C3311 y el gen *fosA7.5* identificado en las cepas C3302, C3314, C3315, C3321 y C3327, son localizados en plásmidos.
4. Elementos como *IS15* y Tn3 flanquean los entornos genéticos del gen *fosA7.5* identificado en cepas de *E. coli* resistentes a fosfomicina, aisladas de carne.
5. Las cepas de *E. coli* aisladas de carne pueden ser multirreplicones.
6. El tamaño promedio de plásmidos identificados en las cepas de *E. coli* aisladas de carne, oscila alrededor de 100 Kb.
7. Los plásmidos IncF, IncI1 y ColE junto con las relaxasas MOB-F y MOB-P fueron los más prevalentes en las cepas de *E. coli* estudiadas.
8. Los sistemas de adicción más comunes de los plásmidos que portan las cepas de *E. coli* aisladas de carne fueron Hok-sok, VagCD y SrnBC.
9. El análisis *in silico* sugiere la posibilidad de que los plásmidos asociados a *fosA7.5* en las cepas C3302, C3321 y C3327 tienen capacidad conjugativa.
10. De los elementos genéticos móviles buscados, las secuencias de inserción *ISEcp1* e *IS26* y transposones de la familia Tn3, fueron los más frecuentemente identificados en las cepas de *E. coli* obtenidas de cárnicos.
11. No se identificó el patotipo STEC en las cepas de *E. coli* aisladas de carne.

## 10. PERSPECTIVAS

1. La elevada CMI de fosfomicina sugiere la ejecución de un monitoreo constante de las cepas de *E. coli* aisladas de alimentos respecto a las características moleculares asociadas a la patogenicidad.
2. Realizar la secuenciación del genoma completo de las cepas resistentes a colistina C3310 y C3312, para identificar el mecanismo de resistencia a colistina.
3. Analizar a profundidad el papel de las mutaciones de los transportadores GlpT y UhpT junto con las mutaciones de CyaA como probables mecanismos de resistencia a fosfomicina.
4. Determinar la localización y contenido del entorno genético de *fosA7* en las cepas restantes (C2337, C2339, C3298, C3319, C3320, C3324 y C4424), mediante la secuenciación del genoma completo.
5. Evaluar la capacidad de conjugación de los plásmidos portadores de *fosA7* que tienen la maquinaria de conjugación.
6. Corroborar la contribución de *fosA7* localizado en plásmido frente a la resistencia a fosfomicina en cepas seleccionadas a través de ensayos de la construcción de mutantes ( $\Delta fosA7$ ).
7. Realizar un estudio comparativo de las cepas aisladas de productos cárnicos portadoras de *fosA7* y *fosL1* con las reportadas en bases de datos públicas.
9. Estudiar otros factores de virulencia que posean las cepas de estudio para conocer una posible asociación con serotipos identificados.
10. Analizar el viruloma y desarrollar ensayos de virulencia de las cepas de *E. coli* aisladas de carne.

## REFERENCIAS

- Abdlla, Y. A., & Al-Sanjary, R. A. (2023). The molecular identification of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) isolated from meat and meat products. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 37(1), 9-15.
- Aghamohammad, S., Khazani Asforooshani, M., Malek Mohammadi, Y., Sholeh, M., & Badmasti, F. (2023). Decoding the genetic structure of conjugative plasmids in international clones of *Klebsiella pneumoniae*: A deep dive into bla KPC, bla NDM, bla OXA-48, and bla GES genes. *Plos one*, 18(11), e0292288.
- Akter, S., Chowdhury, A. M. A., & Mina, S. A. (2021). Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Escherichia coli* isolated from human sewage samples. *Microbiology Insights*, 14, 11786361211016808.
- Alarcón, M. A., Escobar, G. S., Palma, M. E., Chang, A. F., Guaminga, J. R., & Tutillo, D. O. (2020). *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida comercializada en los mercados de Guayaquil. *Journal of America Health*, 3(2), 159–168. <https://doi.org/10.37958/jah.v3i2.45>
- Aldaz, J. D., & Álvarez, G. P. (2020). Estudio comparativo del ácido peracético y ácido acético en microorganismos patógenos presentes en Lactuca sativa. Universidad de Guayaquil.
- Alonso, C. A. (2018). Epidemiología molecular en *Escherichia coli* procedente de fauna salvaje: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética. Universidad de la Rioja.
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>
- Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Soto-Beltrán, M., Lee, B. G., Yambao, J. C., Lugo-Melchor, O. Y., & Chaidez, C. (2016). Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0100-5>
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of basic microbiology*, 58(11), 905-917.
- Balbuena-Alonso, M. G., Cortés-Cortés, G., Kim, J. W., Lozano-Zarain, P., Camps, M., & del Carmen Rocha-Gracia, R. (2022). Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. *Plasmid*, 123–124(September). <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102650>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.

- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano, P., Romero-Romero, S., Lara, N., Estepa, V., Somalo, S., Torres, C., & Rocha-Gracia, R. del C. (2018). Characterization of extended-spectrum and CMY-2  $\beta$ -lactamases, and associated virulence genes in *Escherichia coli* from food of animal origin in México. *British Food Journal*, 120(7), 1457–1473. <https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2018-0104>
- Bastidas-Caldes, C., Guerrero-Freire, S., Ortuño-Gutiérrez, N., Sunyoto, T., Gomes-Dias, C. A., Ramírez, M. S., ... & Calvopiña, M. (2023). Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in humans and backyard animals in Ecuador. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, e48.
- Bethke, J. H., Davidovich, A., Cheng, L., Lopatkin, A. J., Song, W., Thaden, J. T., ... & You, L. (2020). Environmental and genetic determinants of plasmid mobility in pathogenic *Escherichia coli*. *Science advances*, 6(4), eaax3173.
- Blanco, N. (2019). Detección de cepas multirresistentes de *E. coli* mediante análisis de resistencia fenotípica y genotípica, en productos avícolas destinados a consumo humano. Universitat Politècnica de València.
- Bonino, M. P., Crivelli, X. B., Petrina, J. F., Galateo, S., Gomes, T. A. T., Navarro, A., ... & Bentancor, A. (2023). Detection and analysis of Shiga toxin producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in cattle from Tierra del Fuego, Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(2), 1257-1266.
- Bojesen, A. M., Ahmed, U., Skaarup, H., & Espinosa-Gongora, C. (2022). Recurring outbreaks by the same *Escherichia coli* ST10 clone in a broiler unit during 18 months. *Veterinary Research*, 53, 1-7.
- Calero-Cáceres, W., & Balcázar, J. L. (2023). Evolution and dissemination of mobile colistin resistance genes: limitations and challenges in Latin American countries. *The Lancet Microbe*, 4(8), e567-e568.
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International journal of medical microbiology*, 301(8), 654-658.
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology*, 303(6-7), 298-304.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>
- Carbonari, C. C., Miliwebsky, E. S., Zolezzi, G., Deza, N. L., Fittipaldi, N., Manfredi, E., ... & Chinen, I. (2022). The importance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145: NM [H28]/H28 infections in Argentina, 1998–2020. *Microorganisms*, 10(3), 582.
- Carvalho, I., Chenouf, N. S., Cunha, R., Martins, C., Pimenta, P., Pereira, A. R., Martínez-Álvarez, S., Ramos, S., Silva, V., Igrejas, G., Torres, C., & Poeta, P. (2021). Antimicrobial resistance genes and diversity of clones among ESBL-and acquired ampc-producing *Escherichia coli* isolated from fecal samples of healthy and sick cats in Portugal. *Antibiotics*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030262>

- Cernicchiaro, N. (2016). Importancia de la *Escherichia coli* y las toxinas shiga en los sistemas productivos de carne: limitantes productivas y económicas. XLIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. [https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/1312/JB2016\\_82-91.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/1312/JB2016_82-91.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2024). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-Ed34. Vol. 44, no 5.
- Colello, R., Cáceres, M. E., Ruiz, M. J., Sanz, M., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2016). From farm to table: follow-up of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* throughout the pork production chain in Argentina. *Frontiers in microbiology*, 7, 93.
- Colello, R., Krüger, A., Velez, M. V., Del Canto, F., Etcheverría, A. I., Vidal, R., & Padola, N. L. (2019). Identification and detection of iha subtypes in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from humans, cattle and food. *Heliyon*, 5(12).
- Costantino, V., Principe, L., Mehat, J., Buseti, M., Piccirilli, A., Perilli, M., ... & Di Bella, S. (2024). Synergistic Activity of Temocillin and Fosfomycin Combination against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Antibiotics*, 13(6), 526.
- Consuegra, J., Gaffé, J., Lenski, R. E., Hindré, T., Barrick, J. E., Tenailon, O., & Schneider, D. (2021). Insertion-sequence-mediated mutations both promote and constrain evolvability during a long-term experiment with bacteria. *Nature communications*, 12(1), 980.
- Crecencio, R. B., Brisola, M. C., Bitner, D., Frigo, A., Rampazzo, L., Borges, K. A., ... & Stefani, L. M. (2020). Antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genetic profiles of *Escherichia coli* isolated from retail chicken meat. *Infection, Genetics and Evolution*, 84, 104355.
- Darphorn, T. S., Bel, K., Koenders-van Sint Anneland, B., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2021). Antibiotic resistance plasmid composition and architecture in *Escherichia coli* isolates from meat. *Scientific Reports*, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-021-81683-w>
- Darphorn, T. S., Koenders-van Sintanneland, B. B., Grootemaat, A. E., van der Wel, N. N., Brul, S., & Ter Kuile, B. H. (2022). Transfer dynamics of multi-resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated from meat. *Plos one*, 17(7), e0270205.
- De La Rosa-Hernández, M. C., Cadena-Ramírez, A., Téllez-Jurado, A., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Chávez-Urbiola, E. A., & Castro-Rosas, J. (2018). Presence of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Enteropathogenic *Escherichia coli*, and enterotoxigenic *Escherichia coli* on fresh cheeses from local retail

- markets in Mexico. *Journal of Food Protection*, 81(11), 1748–1754. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-166>
- Díez, M., & Cantón, R. (2019). Nuevos aspectos microbiológicos de la fosfomicina. *Official Journal of the Spanish Society of Chemotherapy*, 32(1), 8–18. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>
- Elbediwi, M., Li, Y., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Xie, S., Rajkovic, A., Feng, Y., Fang, W., Rankin, S. C., & Yue, M. (2019). Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria: Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980-2018). *Microorganisms MDPI*, 7, 461. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100461>
- Escalona, O. V. (2014). Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* aisladas en muestras de carne molida expandidas en el Municipio Campo Elías del Estado Mérida-Venezuela 2014. 1–65. <http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/40084.pdf>
- Fang, L. X., Li, X. P., Li, L., Chen, M. Y., Wu, C. Y., Li, L. L., ... & Sun, J. (2018). ISEcp1-mediated transposition of chromosome-borne *bla<sub>CMY-2</sub>* into an endogenous ColE1-like plasmid in *Escherichia coli*. *Infection and Drug Resistance*, 995-1005.
- Fayemi, O. E., Akanni, G. B., Elegbeleye, J. A., Aboaba, O. O., & Njage, P. M. (2021). Prevalence, characterization and antibiotic resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups isolated from fresh beef and locally processed ready-to-eat meat products in Lagos, Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 347. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109191>
- Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M., & Ming Yi, D. (1995). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2188-2191.
- Galarce, N., Sánchez, F., Fuenzalida, V., Ramos, R., Escobar, B., Lapierre, L., Paredes-Osses, E., Arriagada, G., Alegría-Morán, R., Lincopán, N., Fuentes-Castillo, D., Vera-Leiva, A., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., & Borie, C. (2020). Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle and Swine in Chile. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00367>
- Galarce, N., Sánchez, F., Escobar, B., Lapierre, L., Cornejo, J., Alegría-Morán, R., ... & Lincopan, N. (2021). Genomic epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the livestock-food-human interface in South America. *Animals*, 11(7), 1845.
- Galarce, N., Sánchez, F., Kudva, I., Biernbaum, E. N., Knöbl, T., & Saidenberg, A. B. (2023). Insights into Animal Carriage and Pathogen Surveillance in Latin America: The Case of STEC and APEC. In Trending Topics in *Escherichia coli* Research: The Latin American Perspective (pp. 149-175). Cham: Springer International Publishing.
- Galindo-Méndez, M., Navarrete-Salazar, H., Pacheco-Vásquez, R., Quintas-de la Paz, D., Baltazar-Jiménez, I., Santiago-Luna, J. D., & Guadarrama-Monroy, L. (2023). Detection of Plasmid-Mediated Resistance against Colistin in Multi-Drug-Resistant

- Gram-Negative Bacilli Isolated from a Tertiary Hospital. *Microorganisms*, 11(8), 1996.
- García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., & Carattoli, A. (2009). Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 274-281.
- Geurtsen, J., de Been, M., Weerdenburg, E., Zomer, A., McNally, A., & Poolman, J. (2022). Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1–30. <https://doi.org/10.1093/femsre/ruac031>
- Hall, J. P., Botelho, J., Cazares, A., & Baltrus, D. A. (2022). What makes a megaplasmid?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1842), 20200472.
- He, J., Yang, Z., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Liu, M., ... & Zhu, D. (2024). Integrative and conjugative elements of *Pasteurella multocida*: Prevalence and signatures in population evolution. *Virulence*, 15(1), 2359467.
- Herrera, F., Santos, J., & Villamizar, R. (2019). Primer reporte de *Escherichia coli* productora de toxina shiga no O157 que codifica el gen de la enterohemolisina en carne cruda en Colombia TT - First report of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* non-O157 that encodes the enterohemolysin gene in raw. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 69(1), 59–67. <https://www.alanrevista.org/ediciones/2019/1/art-8/#%0Ahttp://fi-admin.bvsalud.org/document/view/ne2tb>
- Huang, Y., Lin, Q., Zhou, Q., Lv, L., Wan, M., Gao, X., Wang, C., & Liu, J.-H. (2020). Identification of *fosA10*, a Novel Plasmid-Mediated Fosfomycin Resistance Gene of *Klebsiella pneumoniae* Origin, in *Escherichia coli*. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1273. <https://doi.org/10.2147/IDR.S251360>
- Jansen, W., van Hout, J., Wiegel, J., Iatridou, D., Chantziaras, I., & De Briyne, N. (2022). Colistin use in European livestock: Veterinary field data on trends and perspectives for further reduction. *Veterinary Sciences*, 9(11), 650.
- Johansson, M. H., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 101-109.
- Jure, M. A., Condorí, M. S., Terrazzino, G. P., Catalán, M. G., Campo, A. L., Zolezzi, G., Chinen, I., Rivas, M., & Castillo, M. (2015). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.006>
- Kempf, I., Jouy, E., & Chauvin, C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International journal of antimicrobial agents*, 48(6), 598-606.
- Kieffer, N., Poirel, L., Descombes, M. C., & Nordmann, P. (2020). Characterization of FosL1, a plasmid-encoded fosfomycin resistance protein identified in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(4), 10-1128.
- Lange, M. E., Uwiera, R. R. E., & Inglis, G. D. (2022). Enteric *Escherichia coli* O157:H7 in

- Cattle, and the Use of Mice as a Model to Elucidate Key Aspects of the Host-Pathogen-Microbiota Interaction: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2022.937866>
- Lee, H., Doak, T. G., Popodi, E., Foster, P. L., & Tang, H. (2016). Insertion sequence-caused large-scale rearrangements in the genome of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 44(15), 7109-7119.
- Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(11), 3087–3095. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA205>
- Liu, Y., Tong, Z., Shi, J., Jia, Y., Yang, K., & Wang, Z. (2020). Correlation between exogenous compounds and the horizontal transfer of plasmid-borne antibiotic resistance genes. *Microorganisms*, 8(8), 1211. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081211>
- Madec, J. Y., & Haenni, M. (2018). Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. *Plasmid*, 99(September), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.001>
- Madoroba, E., Malokotsa, K. P., Ngwane, C., Lebelo, S., & Magwedere, K. (2022). Presence and Virulence Characteristics of Shiga Toxin *Escherichia coli* and Non-Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Products from Animal Protein Supply Chain Enterprises in South Africa. *Foodborne Pathogens and Disease*, 19(6). <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0062>.
- Majewski, P., Gutowska, A., Smith, D. G., Hauschild, T., Majewska, P., Hryszko, T., ... & Tryniszewska, E. A. (2021). Plasmid mediated *mcr-1.1* colistin-resistance in clinical extraintestinal *Escherichia coli* strains isolated in Poland. *Frontiers in Microbiology*, 12, 547020.
- Malesa, R., Pierneef, R., Magwedere, K., Mafuna, T., & Matle, I. (2024). Genomic characterisation of generic *Escherichia coli* from food-producing animals and products of animal origin in South Africa. *Frontiers in Bacteriology*, 3, 1432292.
- Mare, A. D., Ciurea, C. N., Man, A., Tudor, B., Moldovan, V., Decean, L., & Toma, F. (2021). Enteropathogenic *Escherichia coli* - A summary of the literature. *Gastroenterology Insights*, 12(1), 28–40. <https://doi.org/10.3390/GASTROENT12010004>
- Markland, S. M., Lestrangle, K. J., Sharma, M., & Kniel, K. E. (2015). Old Friends in New Places: Exploring the Role of Extraintestinal *E. coli* in Intestinal Disease and Foodborne Illness. *Zoonoses and Public Health*, 62(7), 491–496. <https://doi.org/10.1111/zph.12194>
- Martínez-Vázquez, A. V., Rivera-Sánchez, G., Lira-Méndez, K., Reyes-López, M. Á., & Bocanegra-García, V. (2018). Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from retail meat in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.016>
- Martínez, C. (2018). Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias

de origen humano , animal y ambiental. Universidad Complutense de Madrid.  
<http://eprints.ucm.es/46375/1/T39569.pdf>

- Mattioni Marchetti, V., Hrabak, J., & Bitar, I. (2023). Fosfomycin resistance mechanisms in Enterobacterales: an increasing threat. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1178547.
- Mattioni Marchetti, V., Kraftová, L., Finianos, M., Sourenian, T., Hrabák, J., & Bitar, I. (2023). Polyclonal spread of fosfomycin resistance among carbapenemase-producing members of the Enterobacterales in the Czech republic. *Microbiology spectrum*, 11(3), e00095-23.
- Méndez, C. R., Vergaray, G., Morante, H. Y., Flores, P. R., & Gamboa, R. A. (2013). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157: H7 from ground beef cattle in Lima-Peru. *Rev. Peru. Biol*, 20, 159–164.
- Mir, R. A., & Kudva, I. T. (2018). Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview of prevalence and intervention strategies. *Zoonoses and Public Health*, 66(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/zph.12533>
- Mnif, B., Vimont, S., Boyd, A., Bourit, E., Picard, B., Branger, C., Denamur, E., & Arlet, G. (2010). Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1599–1603. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq181>
- Molina, N. B., Oderiz, S., Vescina, C., Córdoba, A., Basualdo, J. Á., & Sparo, M. D. (2021). First report of diarrheagenic *Escherichia coli* in pediatric outpatient population with diarrhea in La Plata, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.006>
- Narvaez-Bravo, C., Echeverry, A., Miller, M. F., Rodas-Gonzalez, A., Todd Brashears, M., Aslam, M., & Brashears, M. M. (2015). Virulence characterization and molecular subtyping of typical and atypical *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H(2) isolated from fecal samples and beef carcasses in Mexico. *Journal of Food Protection*, 78(2), 264–272. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-348>
- Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C. A., & Hallet, B. (2015). The Tn3-family of replicative transposons. *Mobile DNA III*, 693-726.
- Ohkoshi, Y., Sato, T., Suzuki, Y., Yamamoto, S., Shiraishi, T., Ogasawara, N., & Yokota, S. I. (2017). Mechanism of reduced susceptibility to fosfomycin in *Escherichia coli* clinical isolates. *BioMed Research International*, 2017(1), 5470241.
- Omer, M. K., Álvarez-Ordoñez, A., Prieto, M., Skjerve, E., Asehun, T., & Alvseike, O. A. (2018). A Systematic Review of Bacterial Foodborne Outbreaks Related to Red Meat and Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(10), 598–611. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2393>
- Onyeka, L. O., Adesiyun, A. A., Keddy, K. H., Manqele, A., Madoroba, E., & Thompson, P. N. (2021). Prevalence, risk factors and molecular characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs in Gauteng, South Africa. *Food*

*Control*, 123, 107746.

- Organización Mundial de la Salud: OMS. (2018). *E. coli*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- Pan, Y., Zhang, T., Yu, L., Zong, Z., Zhao, S., Li, R., ... & He, D. (2021). IS 1294 Reorganizes Plasmids in a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e00503-21.
- Panchalingam, S., Antonio, M., Hossain, A., Mandomando, I., Ochieng, B., Oundo, J., ... & Nataro, J. P. (2012). Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. *Clinical infectious diseases*, 55(suppl\_4), S294-S302.
- Partridge, S. R., Enne, V. I., Grohmann, E., Hall, R. M., Rood, J. I., Roy, P. H., ... & Firth, N. (2021). Classifying mobile genetic elements and their interactions from sequence data: The importance of existing biological knowledge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(35), e2104685118.
- Pérez-Etayo, L., Berzosa, M., González, D., & Vitas, A. I. (2018). Prevalence of integrons and insertion sequences in ESBL-producing *E. coli* isolated from different sources in Navarra, Spain. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 2308.
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Quino, W., Mestanza, O., Caro-Castro, J., Hurtado, C. V., & Gavilán, R. G. (2020). Resistoma y genómica comparativa de aislados clínicos de *Escherichia coli* diarreogénica en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37(4), 705–710. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.374.5240>
- Ramadan, H., Soliman, A. M., Hiott, L. M., Elbediwi, M., Woodley, T. A., Chattaway, M. A., ... & Jackson, C. R. (2021). Emergence of multidrug-resistant *Escherichia coli* producing CTX-M, *mcr-1*, and FosA in retail food from Egypt. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 681588.
- Ranjbar, R., Masoudimanesh, M., Safarpour, F., Jonaidi-Jafari, N., & Rahimi, E. (2017). Shiga (Vero)-toxin producing *Escherichia coli* isolated from the hospital foods; virulence factors, o-serogroups and antimicrobial resistance properties. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2017 6:1, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13756-016-0163-Y>
- Ray, L. C., Griffin, P. M., Wymore, K., Wilson, E., Hurd, S., LaClair, B., Wozny, S., Eikmeier, D., Nicholson, C., Burzlaff, K., Hatch, J., Fankhauser, M., Kubota, K., Huang, J. Y., Geissler, A., Payne, D. C., & Tack, D. M. (2022). Changing Diagnostic Testing Practices for Foodborne Pathogens, Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 2012-2019. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(8). <https://doi.org/doi:10.1093/ofid/ofac344>.
- Rega, M., Carmosino, I., Bonilauri, P., Frascolla, V., Vismarra, A., & Bacci, C. (2021).

- Prevalence of ESβL, AmpC and colistin-resistant *E. coli* in meat: A comparison between pork and wild boar. *Microorganisms*, 9(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020214>
- Rípodas, A., Fernández, D., & Martínez, M. (2017). Investigación de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanid. Mil*, 3(73), 147–152. <https://doi.org/10.4321/S1887-85712017000300002>
- Rivas, M., Pichel, M., Colonna, M., Casanello, A. L., Alconcher, L. F., Galavotti, J., ... & Casabona, L. M. (2023). Surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated bloody diarrhea in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(4), 345-354.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., ... & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121-1137.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Shafiq, M., Huang, J., Shah, J. M., Ali, I., Rahman, S. U., & Wang, L. (2021). Characterization and resistant determinants linked to mobile elements of ESBL-producing and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* recovered from the chicken origin. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104722.
- Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., & Rathore, J. S. (2021). Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100047.
- Smith, B. A., Meadows, S., Meyers, R., Parmley, E. J., & Fazil, A. (2019). Seasonality and zoonotic foodborne pathogens in Canada: relationships between climate and *Campylobacter*, *E. coli* and *Salmonella* in meat products. *Epidemiology and Infection*, 147, 1–10. <https://doi.org/doi:10.1017/S0950268819000797>
- Sonika, S., Singh, S., Mishra, S., & Verma, S. (2023). Toxin-antitoxin systems in bacterial pathogenesis. *Heliyon*, 9(4).
- Sorlozano-Puerto, A., Lopez-Machado, I., Albertuz-Crespo, M., Martinez-Gonzalez, L. J., & Gutierrez-Fernandez, J. (2020). Characterization of fosfomicin and nitrofurantoin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated in clinical urine samples. *Antibiotics*, 9(9), 534.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in microbiology*, 9, 2066.
- Sung, K., Nawaz, M., Park, M., Chon, J., Khan, S. A., Alotaibi, K., & Khan, A. A. (2024). Comprehensive Genomic Analysis of Uropathogenic *E. coli*: Virulence Factors,

- Antimicrobial Resistance, and Mobile Genetic Elements. *Pathogens*, 13(9), 794.
- Sunde, M., Simonsen, G. S., Slette-meås, J. S., Böckerman, I., & Norström, M. (2015). Integron, plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* from humans and food included in the Norwegian antimicrobial resistance monitoring programs. *PLoS ONE*, 10(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128797>
- Tang, Y., Zhang, J., Guan, J., Liang, W., Petassi, M. T., Zhang, Y., ... & Peters, J. E. (2024). Transposition with Tn 3-family elements occurs through interaction with the host  $\beta$ -sliding clamp processivity factor. *Nucleic Acids Research*, 52(17), 10416-10430.
- Thapa, S. U., Shrestha, S., Adhikari, N., Rijal, K. R., Shrestha, B., Adhikari, B., ... & Ghimire, P. (2020). Plasmid profiling and occurrence of  $\beta$ -lactamase enzymes in multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Kathmandu, Nepal. *Infection and drug resistance*, 1905-1917.
- Torti, J. F., Cuervo, P., Nardello, A., & Pizarro, M. (2021). Epidemiology and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of hemolytic uremic syndrome in Argentina. *Cureus*, 13(8).
- Tseng, S. P., Wang, S. F., Kuo, C. Y., Huang, J. W., Hung, W. C., Ke, G. M., & Lu, P. L. (2015). Characterization of fosfomycin resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from human and pig in Taiwan. *PLoS One*, 10(8), e0135864.
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., & Van Houdt, R. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical reviews in microbiology*, 43(6), 709-730.
- Varani, A., He, S., Siguier, P., Ross, K., & Chandler, M. (2021). The IS 6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS 26. *Mobile Dna*, 12, 1-18.
- Vega, V., Talavera, M., Barba, J., Zepeda, A. P., & Reyes, N. E. (2020). La resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* aislada de canales y heces bovinas de rastros en el centro de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 991–1003. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5073>
- Vishram, B., Jenkins, C., Greig, D. R., Godbole, G., Carroll, K., Balasegaram, S., & Byrne, L. (2021). The emerging importance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England. *Journal of Medical Microbiology*, 70(7), 001375.
- Wang, L., Qu, K., Li, X., Cao, Z., Wang, X., Li, Z., Song, Y., & Xu, Y. (2017). Use of Bacteriophages to Control *Escherichia coli* O157:H7 in Domestic Ruminants, Meat Products, and Fruits and Vegetables. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(9), 483–493. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2266>
- Wang, J., Stephan, R., Zurfluh, K., Hächler, H., & Fanning, S. (2015). Characterization of the genetic environment of bla ESBL genes, integrons and toxin-antitoxin systems identified on large transferrable plasmids in multi-drug resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 5, 716.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial

genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology*, 13(6), e1005595.

- Xedzro, C., Kimura, T., Shimamoto, T., Ahmed, A. M., & Shimamoto, T. (2023). Comparative molecular profiling of antimicrobial resistance and phylogenetic characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from meat sources in 2009 and 2021 in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 391, 110146.
- Yang, Q. E., Sun, J., Li, L., Deng, H., Liu, B. T., Fang, L. X., ... & Liu, Y. H. (2015). IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Frontiers in microbiology*, 6, 964.
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Gawor, J., Adamska, D., Goryca, K., Szeląg, M., ... & Popowska, M. (2024a). A newly identified IncY plasmid from multi-drug-resistant *Escherichia coli* isolated from dairy cattle feces in Poland. *Microbiology Spectrum*, e00877-24.
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Gawor, J., Adamska, D., Goryca, K., Szeląg, M., ... & Popowska, M. (2024b). The IncC and IncX1 resistance plasmids present in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains isolated from poultry manure in Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-15.
- Zingali, T., Chapman, T. A., Webster, J., Roy Chowdhury, P., & Djordjevic, S. P. (2020). Genomic characterisation of a multiple drug resistant IncHI2 ST4 plasmid in *Escherichia coli* ST744 in Australia. *Microorganisms*, 8(6), 896.

## ANEXOS

### METODOLOGÍAS

#### 6.3.2 Extracción de ADN genómico

##### **Protocolo de extracción de ADN genómico por el kit de extracción “Wizard Genomic DNA Purification”**

###### ***Sedimentación celular:***

1. Se centrifugó 1 ml de cultivo bacteriano incubado overnight en caldo Brain Heart Infusion (BHI), a 13,000 rpm durante 2 min.

###### ***Lisis celular:***

2. Se decantó y se agregaron 600 µl de la solución de *lisis nucleí* y se mezcló con pipeta.
3. Se incubó por 5 min a 80°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
4. Se agregaron 4 µl de RNAsa y se incubó a 37°C por 1 hora. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

###### ***Precipitación de proteínas:***

5. Se agregaron 200 µl de la solución de precipitación y se agitó en vortex durante 20 seg.
6. Se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 13,000 durante 3 min.

###### ***Precipitación y rehidratación del ADN:***

7. El sobrenadante se separó y se transfirió a un tubo con 600 µl de isopropanol y se mezcló por inversión.
8. Se centrifugó a 13,000 durante 2 min y el sobrenadante se desechó. El exceso se absorbió con papel absorbente.
9. Se agregaron 600 µl etanol al 70% y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13,000 durante 2 min.
10. El etanol se aspiró y se dejó secar la pastilla durante 15 min.
11. La pastilla se rehidrató en 100 µl de *solución de rehidratación* y se incubó a 65°C durante 1 hora mezclando continuamente.
12. La concentración de ADN se midió a 260 nm y se almacenó a 4°C.

## **6.7.1 Determinación del tamaño y número de plásmidos**

### **1. Buffer TE**

10mM Tris y 1mM EDTA

- Stock 100 ml de Tris 1M: Pesar 3.028 g de Tris, disolver en agitación y aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.
- Stock 100 ml de EDTA 0.5M pH= 8: Pesar 18.612 g de EDTA, disolver en agitación, ajustar a pH 8 con lentejas de NaOH y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Preparación para 1L: Mezclar 10 ml de Tris 1M + 2 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 1L y esterilizar a 15 libras por 15 min

### **2. Buffer de lisis**

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

Preparación para 100 ml:

- Mezclar 5 ml de Tris 1M + 10 ml de EDTA 0.5M pH= 8 + 80 ml de H<sub>2</sub>O y esterilizar a 15 libras por 15 min.
- Dejar enfriar y agregar 5 ml de sarcosil al 20%.
- Al momento de utilizar, agregar 495 µl de proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®) y mezclar por inversión.

### **3. Buffer TBE 10X (PFGE)**

0.89 M Tris, 0.89 M ácido bórico, 0.02 M EDTA pH= 8

Buffer TBE 10X, para 1L:

- Pesar 10.78 gr de Tris y 5.5 gr de ácido bórico
- Disolverlos en 500 ml de agua destilada, en agitación usando el agitador magnético hasta disolver
- Posteriormente, se agrega 0.7 gr de EDTA (para que este se disuelva se le agrega poco a poco hojuelas de NaOH), en agitación hasta disolver.
- Ajustar las soluciones a pH=8

Aforar con agua destilada a 1L y esterilizar a 1° libras por 10 min.

Finalmente conservar a temperatura ambiente.

### **1. Buffer TAE 50X (Electroforesis de ADN)**

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

Preparación de Buffer TAE 50X, para 500 ml:

- Pesar 30.27 gr de Tris y disolverlos en 100 ml de agua destilada en agitación, usando el agitador magnético.
- Después de disolver el Tris, agregar 7.12 ml de ácido acético glaciado (100%) y agregar 2.32 gr de EDTA 0.5M (para que este se disuelva se le agrega poco a poco hojuelas de NaOH), mezclar con cuidado.
- Ya que este disuelto, se procede a medir el pH de la solución y se ajusta a un pH=8
- Aforar con agua destilada a 500 ml, esterilizar a 15 libras por 15 min y conservar en refrigeración.

### **2. Buffer TAE 1X (Electroforesis de AND)**

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

Preparación de Buffer TAE 1X, para 1L:

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

### **6.7.2 Identificación de la presencia de plásmidos por el método de Kieser**

- **Solución 1:** para 50 ml

- Mezclar 15 ml de Sacarosa 0.3 M con 1.25 ml de Tris-HCl 25mM y 2.5 ml de EDTA 25mM pH=8
- Aforar a 500 ml con de agua destilada, realizar la solución en condiciones de esterilidad y conservar en refrigeración.

- **Solución 2:** para 5 ml

- Mezcla 300  $\mu$ l de NaOH 5M y 1 ml de SDS 10% en 3.7 ml de agua destilada estéril.
- Realizar la solución en condiciones de esterilidad y conservar a temperatura ambiente para que no precipite.